

Aus dem  
Institut der Klinischen Chemie und Molekularen Diagnostik  
- Zentrallaboratorium -  
Geschäftsführender Direktor: Prof. Dr. med. H. Renz

des Fachbereichs Medizin der Philipps – Universität Marburg

In Zusammenarbeit mit dem Universitätsklinikum Gießen und Marburg  
GmbH, Standort Marburg

**Untersuchungen der Expression von Neurotrophinen und  
Neurotrophin- Rezeptoren auf murinen B- Zellen im  
Knochenmark und in der Milz  
von C57BL/6**

INAUGURAL - DISSERTATION

zur

Erlangung des Doktorgrades der gesamten Humanmedizin  
dem Fachbereich Humanmedizin  
der Philipps – Universität Marburg

vorgelegt von

Jörg Emmel

aus

Hadamar

Marburg, 2010

Angenommen vom Fachbereich Humanmedizin der Philipps – Universität  
Marburg am 25.02.2010

Gedruckt mit Genehmigung des Fachbereiches

Dekan:	Prof. Dr. M. Rothmund
Referent:	Prof. Dr. H. Renz
Coreferent:	Prof. Dr. M. Schnare

*Meinen Eltern.*

<b>Inhaltsverzeichnis</b> .....	4-6
<b>Verzeichnis der verwendeten Abkürzungen</b> .....	7-16
<b>1. Einleitung</b> .....	17
<b>1.1 Das Immunsystem</b> .....	17
1.1.1 Das unspezifische Immunsystem.....	18
1.1.2 Das spezifische Immunsystem.....	21
1.1.3 Die Entwicklung von murinen B- Zellen.....	24
<b>1.2 Die Neurotrophine</b> .....	29
1.2.1 Die Mitglieder der NT-Familie.....	31
1.2.2 Die Neurotrophin - Rezeptoren.....	32
1.2.3 Die Neurotrophin - Rezeptor vermittelte Signalkaskade.....	37
1.2.4 Die Rolle der Neurotrophine im Immunsystem.....	41
1.2.5 Die Neurotrophine im Pathomechanismus verschiedener Erkrankungen.....	45
<b>1.3 Zielsetzung der Arbeit</b> .....	48
<b>2. Material und Geräte</b> .....	50
<b>2.1 Tiere</b> .....	50
<b>2.2 Geräte und Hilfsmittel</b> .....	50
<b>2.3 Lösungen und Reagenzien</b> .....	54
<b>3. Methoden</b> .....	61
<b>3.1 Arbeiten mit Tieren</b> .....	61
3.1.1 Haltung und Pflege .....	61
3.1.2 Eigene Zucht.....	61
3.1.3 Präparation der Tiere .....	62
3.1.4 Isolierung von mononukleären Zellen aus Knochenmark und Milz.....	63
3.1.5 Präparation von Gehirn.....	64
<b>3.2 Zellzählung</b> .....	66
<b>3.3 MACS (Magnetic Activated Cell Sorting)</b> .....	67
3.3.1 Prinzip.....	67
3.3.2 Methodischer Ablauf.....	68



<b>3.4</b>	<b>FACS (Fluorescence Activated Cell Scan)</b>	68
3.4.1	Prinzip	68
3.4.2	Methodischer Ablauf	71
3.4.3	Messung	71
<b>3.5</b>	<b>Molekularbiologische Methodik</b>	72
3.5.1	RNA – Gewinnung	72
3.5.2	Transkription der RNA in DNA	73
3.5.3	Qualitative Polymerase– Ketten– Reaktion (PCR)	75
3.5.3.1	Prinzip	76
3.5.3.2	Methodische Durchführung	81
3.5.4	Agarosegelelektrophorese	83
3.5.5	Quantitative PCR mittels LightCycler®	84
3.5.5.1	Prinzip	84
3.5.5.2	Methodische Durchführung	88
3.5.5.3	Auswertung am Computer	89
<b>4.</b>	<b>Ergebnisse</b>	90
<b>4.1</b>	<b>Charakterisierung der C57BL/6 Wildtyp- Maus</b>	90
4.1.1	Präparation, Zellgewinnung und Zellzählung	90
4.1.2	MACS (Magnetic Activated Cell Sorting)	93
4.1.3	FACS (Fluorescence Activating Cell Scan)	96
4.1.3.1	Zellverteilung im Knochenmark	96
4.1.3.2	Zellverteilung in der Milz	102
<b>4.2</b>	<b>Qualitativer PCR</b>	104
4.2.1	Ergebnisse der molekularbiologischen Methodenetablierung	104
4.2.2	NT– und NT–Rezeptor– Expression im Gehirn als Standard und Kontrolle	108
4.2.3	NT– und NT–Rezeptor– Expression auf B220 positiven B-Zellen im KM	110
4.2.4	NT– und NT–Rezeptor– Expression auf B220 positiven B-Zellen in der Milz	112
4.2.5	Der TrkB (gp145) wird nicht von B-Zellen exprimiert	114
<b>4.3</b>	<b>Quantitative PCR</b>	115

4.3.1 NT– und NT–Rezeptor– Expression im Gehirn als Standard und Kontrolle.....	116
4.3.2 Neurotrophin- Expression der B-Zellen von KM und der Milz... ..	120
4.3.3 Neurotrophin- Rezeptor- Expression der B-Zellen von KM und der Milz.....	126
4.3.4 Zusammenfassung der Ergebnisse.....	130
<b>5. Diskussion.....</b>	<b>131</b>
5.1 Das zelluläre Milieu im KM und der Milz.....	131
5.2 Expression von Neurotrophen und Neurotrophin- Rezeptoren auf murinen B-Zellen.....	133
5.3 Different Expression von Neurotrophin- Rezeptoren und Neurotrophen auf murinen B-Zellen des KM und der Milz.....	135
5.4 Ausblick.....	139
<b>6. Zusammenfassung.....</b>	<b>140</b>
<b>7. Literaturverzeichnis.....</b>	<b>142</b>
<b>8. Abbildungsverzeichnis.....</b>	<b>176</b>
<b>9. Tabellenverzeichnis.....</b>	<b>180</b>
<b>10. Danksagung.....</b>	<b>183</b>
<b>11. Persönliche Daten.....</b>	<b>184</b>
11.1 Verzeichnis der akademischen Lehrer.....	184
11.2 Lebenslauf.....	185
11.2 Publikationen und Poster.....	185
11.3 Eidesstattliche Erklärung.....	186

## Verzeichnis der verwendeten Abkürzungen

A	Adenin
Abb.	Abbildung
AK	Antikörper
Akt/PKB	<i>V-Akt murine thymoma viral oncogene homolog 1</i> / Proteinkinase B
APC	<i>antigen - presenting cell</i> ; Antigen präsentierende Zelle
B220	Entwicklungsmarker aller B-Zellen; entspricht CD45R
Bad	Bcl- assoziierter „desth- promotor“; proapoptose- auslösendes Molekül
BCR	<i>b-cell-receptor</i> , B-Zell-Rezeptor
BDNF	Brain Derived Neurotrophic Factor
β- ME	Beta- Mercaptoethanol
bp	Basenpaare
BSA	Bovines Serum Albumin
B-Zelle	Lymphozytensubpopulation, im KM entwickelt; Name ursprünglich von <i>bursa fabricii</i>
bzw.	beziehungsweise
©	Copyright
C	Cytosin
CA	Canada
C1 – 9	Komplementfaktor 1 - 9
C3	Komplementfaktor 3
C3a/ C3b	Komplementfraktion von Komplementfaktor C3
C3bBb	C3 – Konvertase – Komplex
C5a	Fraktion von C5, Anaphylatoxin
°C	Grad in Celsius
Ca <sup>2+</sup>	Calcium (ionisierte Form)
CCI	cystein- cluster 1
CCII	cystein- cluster 2

CD	Differenzierungsmerkmal einer Zelle ( <i>cluster of differentiation</i> )
CD117	c-kit, Oberflächentirosinkinaserzeptor zur Interaktion der unreifen Vorläufer-B-Zellen mit dem KM-Stromazellen
CD127	Interleukin-7-Rezeptor- $\alpha$ -Kette
CD135	Entwicklungsmarker der myeloiden und lymphatischen Vorläuferzellen und hämatopoetischen Stammzellen; entspricht Flk-2, Flt-3, Ly-72
CD11b/ CD18 Integrin	Komplementrezeptor 3 (CR3)/ MAC-1
CD14	Rezeptor auf Monozyten/ Makrophagen für LBP
CD19	Marker aller B-Zellen außer der Pre- Pro- B- Zelle; entspricht B4
CD25	Interleukin-2-Rezeptor- $\alpha$ -Kette
CD30	Oberflächen- Glykoprotein, auch Ki-1 genannt; zur T-Zell- Aktivierung und Differenzierung: Ligand ist CD153
CD32/ CD16/ CD64	Fc- Rezeptor
CD34	Marker für hämatopoetische Stammzellen und für Endothel; entspricht dem Mucosialin
CD35	C3b- Rezeptor, CR1
CD3e	T-Zell-Marker; entspricht der $\epsilon$ - Kette des CD3-Markers
CD40	gp39-Rezeptor auf den meisten B-Zellen, Ligand ist CD154 (gp39; Ly-62) für Proliferation, Differenzierung und Überleben
CD45	Marker aller Leukozyten; entspricht dem Ly-5, T200, LCA
CD45R	Marker aller B- Zellen; entspricht dem B220
CD153	Ligand des CD30
CD154	gp39, Ly-62; Ligand des CD40 (gp39-Rezeptor) auf den B-Zellen
cDNA	Kopie-DNA ( <i>copy-DNA/ complementary-DNA</i> )

c-fos	antiapoptotischer Transkriptionsfaktor in der trk-Rezeptor vermittelten Signalkaskade
CGRP	<i>calcitonin gene-related peptide</i> ; Tachykinin in den Nervenzellen der Haut im Rahmen inflammatorischen neurogenen Entzündung
Cl <sub>2</sub>	Chlorid
C57BL/6	Bezeichnung eines Wildtyp- Mauszuchtstammes
CR1	Komplementrezeptor 1 = CD35
CR3	Komplementrezeptor 3 = CD11b/ CD18 Integrin/ MAC-1
cRA	chronische rheumatoide Arthritis
CREB	<i>cyclic AMP-response element binding</i> ; trk-Rezeptor assoziiertes Signalkaskade- Element
C <sub>T</sub>	PCR- Zyklus, bei dem die Schwelle ( <i>Threshold</i> ) überschritten wird; sog. Schwellenzyklus
C <sub>T</sub> B-A	Schwellenzyklus der Produkte des Primers für Beta-Aktin
C <sub>T</sub> BDNF	Schwellenzyklus der Produkte des Primers für BDNF
C <sub>T</sub> NGF	Schwellenzyklus der Produkte des Primers für NGF
C <sub>T</sub> NT-3	Schwellenzyklus der Produkte des Primers für NT-3
C <sub>T</sub> trkB(gp 95)	Schwellenzyklus der Produkte des Primers für trkB (gp 95)
C <sub>T</sub> trkC	Schwellenzyklus der Produkte des Primers für trkC
d	Tag ( <i>dies</i> )
D	Deutschland
Δ	Differenz
DA	Dalton (Molekulargewichtangabe)
DC	<i>dendritic cell</i> ; Dendritische Zelle
DEPC	Diethyl- Pyrocarbonat
d.h.	das heißt

DNA	Desoxyribonukleinsäure ( <i>Desoxyribonucleid acid</i> )
dATP	Desoxyadenosintriphosphat
dCTP	Desoxycytidintriphosphat
dGTP	Desoxyguanosintriphosphat
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphat
dTTP	Desoxythymidintriphosphat
DTT	1,4- Dithiothreitol
et al.	<i>et alii</i> ; und andere
EBV	Ebstein- Barr- Virus
E. coli	Escherischia coli
EDTA	<i>ethylen-diamin-terta-acetat</i> ; Ethylen- Diamin- Tetra- Essigsäure
EGF	<i>epidermal growth factor</i> ; Epidermis- Wachstumsfaktor
ELISA	<i>enzyme-linked immunosorbent assay</i>
ERK 1/2	<i>extracellular- signal- regulated- kinase 1/2</i> ; Signalkaskade- Adapterprotein der intrazellulären Signalkaskade der trk- Rezeptoren
etc.	<i>et cetera</i> ; und weitere
FACS	Fluoreszenz Aktivierte Zell Abtastung ( <i>Fluorescence Activated Cell Scan</i> )
Fab	<i>fragment of antigen binding</i> ; Antigen bindendes Fragment der Antikörper
Fas	<i>fatty acid synthase</i> ; Fettsäuresynthase
Fc	<i>fragment crystallizable</i> ; nicht antigen- bindendes Fragment der Antikörper, aktiviert Komplementfaktor C1
Fc-Rezeptor	verschiedene Rezeptoren, die das Fc-Fragment der AK erkennen; entspricht CD16, CD32, CD64
FITC	Fluorecein- Isothiocyanat
FKS	Fetales Kälber Serum
FSC	Vorwärtsstreulicht ( <i>Forward scatter</i> )
FW	<i>forward</i> ; vorwärts
g	Erdbeschleunigung ( <i>gravity</i> )

G	Guanin
Ggs.	Gegensatz
GPI- Anker	Glykosylierter- Phosphatidylinositol- Anker
Grb2	<i>growth factor receptor- bound protein 2</i> ; Adapterprotein der intrazellulären Signalkaskade der trk- Rezeptoren
GSK3	Glykogen- Synthasekinase- 3; proapoptotisches Molekül
GSP	Genspezifischer Primer
h	Stunde ( <i>hora</i> )
H	<i>heavy</i> ; Abkürzung für die schwere Kette der Immunglobuline
HK-1	Hämokinin-1; Ligand des Substanz-P-Rezeptors
HLA	<i>humane leucocyte antigen</i> ; Humane-Leukozyten-Antigen
HSC	<i>hematopoietic stem cell</i> : Hätopoetische Stammzelle; Vorläuferzelle der myeloiden und lymphoiden Zellreihe
I	Stromstärke (in Ampere)
i.d.R.	in der Regel
Ig	Immunglobulin, Antikörper
Ig I	Immunglobulin- ähnliche Region 1
Ig II	Immunglobulin- ähnliche Region 2
IgA	Immunglobulin A
IgD	Immunglobulin D
IgG	Immunglobulin G
IgM	Immunglobulin M
IL-2	Interleukin 2
IL-2-R.	Interleukin-2-Rezeptor, CD25
IL-7	Interleukin 7
IL-7-R.	Interleukin-7-Rezeptor, CD127
INF- $\gamma$	Interferon-Gamma
IP3	1,4,5-Inositol-Triphosphat

JNK	Jun N-Terminale Kinase; Teil der pro-apoptotischen Signalkaskade; entspricht der SAPK
Kap.	Kapitel
kBp	Kilobasenpaare
kDa	Kilo- Dalton (Molekulargewichtangabe)
KM	Knochenmark
L / l	Liter
L	<i>light</i> ; Abkürzung für die leichte Kette der Immunglobuline
LAK	Lymphokin- aktivierte Killerzellen
LBP	Lipopolysaccharid- bindendes Protein
LGL	large granulated lymphocytes; große granulierte Lymphozyten
Log	Logarithmus
LRM	<i>leucin- rich motif</i> ; leucin-reiches Motiv im NT-Rezeptor
Ly-6G	Entwicklungsmarker der Granulozyten; entspricht Gr-1
M	Molar
mA	Milli- Ampere ( $10^{-3}$ A)
MAC	<i>membrane attack complex</i> ; membran-zerstörender Komplex durch Komplementfaktoren
MAC	Makrophage
MACS	Magnetisch aktivierte Zell Sortierung ( <i>Magnetic Activated Cell Sorting</i> )
MAC-1	Komplementrezeptor 3 (CR3), CD11b, CD18 Integrin
MAC-3	Entwicklungsmarker der Makrophagen
MAPS	MBL ( <i>mannose-binding lectin</i> ) -associated-serine-protease
MAPK	mitogen- aktivierte Proteinkinase
MAPKK	MAPK- Kinase; trk- Rezeptor vermittelte Signalkaskade- Protein- Kinase



MBL	<i>mannose-binding lectin</i> ; Mannose bindendes Lektin
MFR	Mannosyl- Fucosyl- Rezeptor der Monozyten/ Makrophagen
Mg <sup>2+</sup>	Magnesium
MgCl <sub>2</sub>	Magnesiumchlorid
MHC	major - histocompatibility - complex, Major-Histokompatibilitäts- Komplex; Hauptgewebe-verträglichkeitskomplex
Min/ min	Minute
MKK1/2	MAPK- Kinase 1/2; trk- Rezeptor- Signalkaskade-Kinase
ml	Milliliter (10 <sup>-3</sup> l)
µg	Mikrogramm (10 <sup>-6</sup> g)
µl	Mikroliter (10 <sup>-6</sup> l)
µM	Mikromolar (10 <sup>-6</sup> M)
mm	Millimeter (10 <sup>-3</sup> m)
mm <sup>3</sup>	Kubikmillimeter
mM	Millimolar (10 <sup>-3</sup> M)
MW	Mittelwert
n	Probanden-/ Versuchstierzahl
NADE	<i>neurotrophin- associated cell death executor</i> ; Adapterprotein der p75 <sup>NTR</sup> - Signalkaskade
NFκB	<i>nuclear factor kappa B</i>
ng	Nanogramm (10 <sup>-9</sup> g)
NGF	Neuronal Growth Factor
NK- Zellen	Natürliche Killer- Zellen
nm	Nanometer (10 <sup>-9</sup> m)
Non-Rev.-T.-Kontrolle	Nicht Reverse Transkriptase Kontrolle
N.R.	<i>no rearrangement</i> ; Gene vor dem Vorgang des Rearrangement der Gene für die Immunglobuline
NRAGE	<i>neurotrophin- receptor interacting MAGE homologue</i> ; Adapterprotein der p75 <sup>NTR</sup> - Signalkaskade

NRIF	<i>neurotrophin- receptor interacting factor</i> ; Adapterprotein der $p75^{\text{NTR}}$ - Signalkaskade
NT	Neurotrophin
NT-3	Neurotrophin-3
NT-Rezeptor	Neurotrophinrezeptor
NTs	Neurotrophine ( <i>neurotrophins</i> )
P	Elektrische Leistung, Wärmestrom (in Watt)
PAN-NK	Marker der NK- Zellen; entspricht DX5- Marker
PBS	Phosphate Buffered Saline ( $\text{Mg}^{2+}$ -/ $\text{Ca}^{2+}$ - frei; pH 7,3)
PCR	Polymerase Ketten Reaktion ( <i>polymerase chain reaction</i> )
PDGF	<i>platelet- derived growth factor</i> ; Plättchen- Wachstumsfaktor
PE	Phycoerythrin
pH	Potentia Hydrogenii; Konzentration der $\text{H}^+$ -Ionen
PI3-K	Phosphatidylinositol-3-Kinase
PLC- $\gamma$ 1	Phospholipase- $\gamma$ 1
PTP	Protein- Tyrosin- Phosphatase
®	Registriert
Raf	<i>rat fibroma</i> ; Proteinkinase der intrazellulären Signalkaskade der trk- Rezeptoren
RAG-1/-2	<i>recombinase-activating gene 1 and 2</i> ; VDJ- Rekombinationsmaschine zur Rekombination der Gensegmente für die Immunglobulinketten der B- Zellen
Ras	<i>rat sarcoma</i> ; GTPase der trk- Signalkaskade
Rev. T.	Reverse Transkriptase
RIP2	<i>receptor interacting protein 2</i> ; Signalkaskadeprotein des $p75^{\text{NTR}}$
RNA	Ribonukleinsäure ( <i>Ribonucleid acid</i> )
mRNA	Boten- RNA ( <i>Messenger- RNA</i> )
rRNA	Ribosomale RNA
rpm	Umdrehungen pro Minute ( <i>rounds per minute</i> )

RSK2	p90/ribosomale-S6-Kinase; Signalkaskadeprotein-kinase der trk- Signalkaskade
RT	Raumtemperatur
RV	<i>reverse</i> ; rückwärts
S	Svedberg- Einheit
s/ sec.	Sekunde
SAPK	<i>stress-activated protein kinase</i> ; Stress- aktivierte Proteinkinase, Teil der proapoptotischen Signalkaskade; entspricht der JNK
SD	Standardabweichung ( <i>Standard difference</i> )
Shc	src- homologes Motiv, Adapterprotein der trk- Rezeptor- Signalkaskade
SMC	<i>small muscle cell</i> ; glatte Muskelzelle
SLE	systemischer Lupus erythemotodes
SOS	<i>son of sevenless</i> ; Adapterproteinkomplex der trk- Signalkaskade
SP	Signalpeptid
SSC	Seitwärtsstreulicht ( <i>sideward scatter</i> )
Std.	Stunde
Surrogat-L-Kette	<i>surrogat-light-chain</i> ; Ersatz-Leichte Kette für den Prä-B-Zell-Rezeptor im Rahmen der B-Zell-Entwicklung
T	Thymin
T <sub>a</sub>	Anlagerungs- ( <i>Annealing</i> -) Temperatur
Tab.	Tabelle
Taq	Thermus aquaticus, thermophiler Archäo-Bakterienstamm
TBE	Tris- Borat- EDTA- Puffer
TCR	<i>t-cell-receptor</i> , T-Zell-Rezeptor
TdT	<i>terminal deoxynucleotidyl transferase</i> ; Rekombinationsmaschine zur Immunglobulin-kettenrekombination der B-Zelle
T <sub>e</sub>	Polymerisations- ( <i>Extension</i> -) Temperatur
TER-119	Marker für Erythrocyten; entspricht Ly-76

$T_H1$	CD4-positive $T_1$ -Helfer-Zellen
$T_H2$	CD4-positive $T_2$ -Helfer-Zellen
$T_m$	Schmelz- ( <i>Melting</i> -) Temperatur
TNF	Tumor- Nekrose- Faktor
TNF- $\alpha$	Tumor- Nekrose- Faktor $\alpha$
TRAF	<i>TNF-receptor associated factor</i> ; $p75^{NTR}$ - vermittelte Signalkaskade-Protein
trk	Tyrosinkinase- Glykoprotein- Rezeptor
trk A, B, C	Tyrosin- Kinase- Rezeptor für NT (NT- Rezeptor)
tRNA	Transfer- RNA
TSchG	Tierschutzgesetz
TSchV	Tierschutzverordnung
Tyr	Tyrosinrest in der trk- Rezeptor- Kinase- Domäne, die phosphoryliert wird
T- Zelle	Lymphozytensubpopulation, im Thymus entwickelt
U	Elektrische Spannung (in Volt)
UV- Licht	Ultraviolett- Licht
V	Volt
W	Watt
z. Bsp.	zum Beispiel
ZNS	zentrales Nervensystem

## 1. Einleitung

Die vorrangige Zielsetzung immunologischer Forschung der letzten Jahrzehnte des 20. Jahrhunderts bestand in der Klärung molekularer und zellulärer Mechanismen von Immunreaktionen, sowohl gegen externe körperfremde, als auch körpereigene Antigene, der Regulation der Antikörper-Diversität und der komplexen Abläufe der Entstehung der Eigentoleranz. Die wesentlichen Erkenntnisse dieser Forschung sind das Verständnis um die verschiedenen zellulären und molekularen Bestandteile des Immunsystems sowie deren Interaktion innerhalb verschiedener komplexer Abläufe der Immunantwort.

In den letzten 20 Jahren verlagerte sich zunehmend der Schwerpunkt immunologischer Forschung auf die Untersuchung der Interaktion verschiedener Körpersysteme mit dem Immunsystem. Dabei geht es um die Klärung, welche zellulären und molekularen Bestandteile diese gegenseitige Beeinflussung bedingen und welche Übereinstimmung hinsichtlich Rezeptoren, Mediatoren und molekularen Mechanismen existieren.

### 1.1 Das Immunsystem

Jeder Organismus muß sich permanent gegen eine Vielzahl infektiöser Mikroorganismen wie Viren, Bakterien, Parasiten und Pilzen und organischen sowie anorganischen Partikeln schützen. Im Laufe der evolutionären Entwicklung haben sich verschiedene Mechanismen aus zelluläre wie nicht zelluläre Bestandteilen entwickelt, die einer effektiven Abwehr dienen und die Integrität des Körpers gewährleisten, wobei es nur selten zu einer für den Organismus relevanten Schädigung kommt.

Die Abwehrreaktion des Organismus ist durch eine frühe angeborene unspezifische Immunantwort – Reaktion innerhalb von Stunden – und durch eine spätere erworbene spezifische Immunantwort – Reaktion in Tagen – charakterisiert (*Janeway et al. 1995; Roit et al. 1995; Sahle et al. 2001; Fätkenheuer et al. 2003*).

### 1.1.1 Das unspezifische Immunsystem

Ein eindringender Mikroorganismus wird zuerst mit dem unspezifischen, angeborenen (nicht adaptive) Immunsystem konfrontiert. Dadurch werden direkte Effektorfunktionen zur weiteren Bekämpfung der Pathogenen eingeleitet (*Sahle et al. 2001; Roit et al. 1995*).

Das unspezifische Immunsystem reagiert sehr schnell immer auf dieselbe Art und Weise, daher unspezifisch und pathogen-unabhängig, z. Bsp. auf allgemein vorkommende Strukturen der Zelloberfläche von Bakterien. Es stellt jedoch die zweite Linie der Verteidigung dar. Die erste Schutzbarriere stellen biochemische (Lysozyme in vielen Sekreten, kommensale Keime von Darm und Vagina, Talgdrüsensekrete der Haut) und physikalische (Schleim, pH- Wert der Magensäure, Flimmerepithel der Luftwege zum Abtransport von Fremdstoffen nach außen) Barrieren der Haut und der Schleimhäute dar (*Roit et al. 1995; Fätkenheuer et al. 2003*). Durchdringt ein Pathogen diese erste Verteidigungslinie wird es mit der unspezifischen angeborenen Immunität konfrontiert, repräsentiert durch 3 Komponente: das phagozytierende System, bestehend aus kurzlebigen Granulozyten und langlebigen mononukleären Phagozyten (Monozyten des Blutes, Gewebsmakrophagen, Kupffer-Stern-Zellen des Leber, Synovia-A-Zellen der Synovialhöhle), dem Komplementsystem, eine Gruppe von ca. 20 Serumproteinen, und natürlichen „Killerzellen“, große granulierte Lymphozyten, die unspezifische Erkennungssysteme anwenden, um beispielsweise Tumorzellen oder virusinfizierte Zellen zu erkennen (*Roit et al. 1995; Fätkenheuer et al. 2003*).

Dabei setzen sie eine große Zahl an Proteinen frei, die für eine Signalübermittlung zwischen Immunzellen verantwortlich sind, die Zytokine. Zudem präsentieren sie Antigenbestandteile der phagozytierten Mikroorganismen auf ihrer Oberfläche und bewirken so als „Antigenpräsentierende Zelle“ (APC) neben der Zytokinproduktion eine Aktivierung des spezifischen Immunsystems (*Roit et al. 2003; Fätkenheuer et al. 2003*). Im Folgenden werden diese 3 Komponenten des unspezifischen Immunsystems kurz dargestellt:

- a. Das Komplementsystem besteht aus ca. 20 verschiedenen Serumproteinen, gebildet in der Leber. Diese löslichen zirkulierenden Moleküle steuern in ihrer Gesamtfunktion die Entzündung (*Roit et al. 1995; Fätkenheuer et al. 2003*) mit dem Ziel, pathogene Mikroorganismen zu zerstören und die anderen Komponenten des Immunsystems zu interagieren. Dabei läuft Aktivierung des Komplementsystems in einer Kaskade ab, wobei einzelne Bestandteile des Komplementsystems sequentiell aufeinander einwirken.

Die Aktivierung kann über 3 verschiedene Wege erfolgen:

1. Der klassische Weg: Dieser Pfad ist antikörperabhängig.
2. Der alternative Weg: Dieser Pfad ist unspezifisch, angeboren. Schlüsselement ist der Komplementfaktor C3.
3. Der Lektin - Weg: Das Mannose bindende Lektin (MBL), ein Protein der Leber, bildet mit einem anderen Protein im Serum (MAPS) einen Komplex, der als C3-Konvertase fungiert.

Daneben fungieren einige dieser Komplementfaktoren als Opsonine und Chemoattraktanten. Zudem kommt es durch die ablaufende Komplement- Kaskade zu einer Verstärkung der Durchblutung und Erhöhung der Kapillarpermeabilität (*Roit et al. 1995; Fätkenheuer et al. 2003*).

- b. Die professionellen Phagozyten sind eine heterogene Gruppe der Leukozyten. Darunter die Granulozyten: sie gehören zu der Gruppe der polymorphkernigen Leukozyten und repräsentieren ca. 60 – 70% der gesamten Leukozyten im Blut und stellen die Hauptakteure der unspezifischen Immunität dar. Man unterscheidet hinsichtlich des spezifischen Färbeverhaltens ihrer intrazellulären Granula in Untergruppen: neutrophile (ca. 90%), eosinophile (ca. 2 – 5%) und basophile (ca. 1,2 – 1%) Granulozyten. Ihre Funktion besteht in der Phagozytose. Sie haben zudem mehrere funktionelle Eigenschaften wie Rolling, Adhäsion, Chemotaxis, Migration und

Diapedese. Die Phagozytose verläuft in 3 Schritten: *Attachment* (Anheftung des Granulozyten an das Pathogens), *Ingestion* (Einschluß des Pathogens durch Endozytose) und *Killing* (intrazelluläre Abtötung des Pathogens durch „oxidativen burst“ mittels Superoxide und einem Cocktail von antimikrobiellen Proteinen wie Lysozyme, Laktoferrin, Defensine, proteolytische und hydrolytische Enzyme). Eine wichtige Voraussetzung ist die vorrangegangene Opsonierung.

Die andere Gruppe der „professionellen“ Phagozyten stellt das mononukleäre Phagozytensystem dar, bestehend aus gewebsständigen Makrophagen und Monozyten des Blutes. Die Monozyten zirkulieren im Blut und treten ins Gewebe über, wo sie zu Gewebsmakrophagen werden (*Roit et al. 1995; Fätkenheuer et al. 2003*). Sie haben zwei Hauptfunktionen: Phagozytose und Antigen-Präsentation. Über den MHC-Klasse II-Komplex präsentieren sie vor allem den T-Helfer-Zellen phagozytierte Antigene und spielen so eine entscheidende Rolle bei der Induktion der Aktivierung von T-Zellen. Dies ist die entscheidende Verbindungsstelle zwischen unspezifischen und spezifischen Immunsystem.

- c. Eine weitere Zellgruppe, die eine Zwischenstufe zwischen unspezifischen und spezifischen Immunsystems darstellen, sind die natürlichen Killerzellen (NK-Zellen), eine Gruppe großer Lymphozyten (LGL). Ihre Zytotoxizität ist nicht MHC-restringiert (*Pawelec et al. 1994, Roit et al. 1995; Fätkenheuer et al. 2003, Schrezenmeier et al. 2006*). Über einen IL-2-Rezeptor werden sie bei Anwesenheit von IL-2, produziert von T-Helfer-Zellen, aktiviert (*Teichmann et al. 1992, Uharek L. et al. 1996, Pawelec et al. 1994, Son Y.I. et al 2001, Schrezenmeier et al. 2006*), aus diesem Grund werden sie auch als LAK (Lymphokin-aktivierte Killerzellen) bezeichnet. Daneben besitzen sie eine Vielzahl an aktivierenden und deaktivierenden Rezeptoren. Sie nehmen unspezifische zytotoxische Funktionen gegen Tumorzellen, virusinfizierte Zellen



und IgG- beschichtete Oberflächen über einen Fc- Rezeptor als Teil des angeborenen Immunsystems wahr.

Daneben sezernieren sie verschiedene Moleküle der Tumor-Nekrose-Faktor- Familie wie TNF- $\alpha$  (*Storkus W.J. et al. 1991, Smyth M.J. et al. 2003, Schrezenmeier et al. 2006*). Über einen inhibierenden Rezeptor, der MHC-Klasse-I- Moleküle erkennt, wird eine Schädigung von „gesunden“ Zellen verhindert.

### 1.1.2 Das spezifische Immunsystem

Das Funktionsprinzip des erworbenen antigenabhängigen Immunsystems basiert auf dem spezifischen Erkennen von Makromolekülen und Antigene und deren Zuordnung zu „Fremd“ oder „Selbst“. Aus diesem Grund wird die spezifische Immunantwort auch als „adaptive“ Immunantwort bezeichnet. Zudem ist das spezifische Immunsystem durch die Entwicklung und Aufrechterhaltung eines immunologischen Gedächtnisses nach z. Bsp. abgelaufener Infektion charakterisiert (*Fätkenheuer et al. 2003*). Träger dieser Immunantwort sind die Lymphozyten und deren Produkte, die sich im Knochenmark aus einer gemeinsamen lymphatischen Vorläuferzelle entwickeln (*Roit et al. 1995; Fätkenheuer et al. 2003*). Das Knochenmark und der Thymus, in dem die Ausreifung der T-Lymphozyten (T-Zellen) stattfindet, werden als *primäre* Lymphorgane bezeichnet. Hier findet die antigenunabhängige Zellproliferation der Lymphozyten statt. Alle Lymphozyten sind einem komplexen Ausreifungsprozeß in den primären Lymphorganen unterworfen, wodurch sie ihre phänotypische und funktionelle Ausstattung erhalten.

Die Komponenten, die eine solche Immunantwort hervorrufen und welche spezifisch erkannt werden, werden als Antigene bezeichnet. Diese werden je nach Herkunft und Zugehörigkeit als Xenoantigene (Fremdantigene), Autoantigene (körpereigen) und Alloantigene (spezies-spezifisch) unterschieden.

Charakteristisch für das spezifische Immunsystem ist, dass sie gegen bestimmte strukturelle Komponenten der Antigene, so genannte *antigene*

*Determinanten* oder *Epitope* gerichtet sind. Diese können linear, in der Abfolge ihrer Aminosäuren, oder konformationell, d.h. durch ihre Struktur definiert sein (*Fätkenheuer et al. 2003*).

Die Zellen des spezifischen Immunsystems zirkulieren nach ihrer Ausreifung in den primären Lymphorganen im Blutkreislaufsystem sowie in der Lymphe und treten in den *sekundären* Lymphorganen – Milz, Lymphknoten, das mukosa-assoziierte Lymphgewebe (MALT) des Gastrointestinaltraktes und der Atemwege einschließlich der Tonsillen - mit anderen nicht-lymphoiden Zellen in Kontakt. Hier vermitteln Adhäsionsmoleküle und Zytokine die Interaktion zwischen den Zellen. Zudem werden durch die spezifische Immunabwehr mittels Zytokine und Chemokine die Mechanismen der unspezifischen Abwehr induziert und verstärkt, indem z.Bsp. Phagozyten an den Ort des Immungeschehens gelockt werden (*Hale et al. 1998; Hayes et al. 1998*).

Die spezifische Immunantwort besteht aus zwei Komponenten, der humoralen und der zellulären (*Abbas et al. 2000*).

Die humorale Immunantwort besteht aus löslichen und zirkulierenden Antikörper, die von zu Plasmazellen differenzierten B-Zellen sezerniert werden und in den verschiedenen Körperflüssigkeiten nachgewiesen werden können. Diese Antikörper sind spezifisch für die jeweils zu neutralisierenden Antigene. Sie stellen den wesentlichen Effektormechanismus (Infektivität bestimmter Erreger neutralisieren/ Opsonierung/ Aktivierung des Komplementsystems) dar (*Abbas et al. 2000; Roit et al. 1995; Fätkenheuer et al. 2003*). Die Ausreifung und Differenzierung der B-Zelle wird im Kapitel 1.1.3 erläutert.

Aus einem Stammzellklon entstehen ca.  $10^{12}$  B-Lymphozyten, die sich hinsichtlich der variablen Region ihres B-Zell-Rezeptors (BCR) unterscheiden. Diese Varianz erklärt sich durch eine hohe Zahl an Variationsmöglichkeiten einiger Gensegmente der DNA der B-Zellen. Dieser BCR ist spezifisch für das jeweilige Antigen. Wird ein Antigen durch diesen BCR erkannt kommt es zu einer Aktivierung der B-Zelle. Es folgt die Proliferation der B-Zelle zu einer Plasmazelle, die Antikörper mit derselben Spezifität wie der BCR produziert. Hilfe bei der Aktivierung erhalten die B-

Zellen zudem durch einen zweiten Stimulus durch die CD4-positiven T-Helfer-Zellen.

Die zellvermittelte Immunantwort des spezifischen Immunsystems gegen zellgebundene Antigenfragmente wird durch die T-Zellen vermittelt (*Abbas et al. 2000; Roit et al. 1995; Fätkenheuer et al. 2003*).

Die Reifung der T-Zellen erfolgt im Thymus nach Auswanderung der T-Zell-Vorläufer-Zellen aus dem Knochenmark und der fetalen Leber initial in die subkapsulären Sinus, später im Kortex des Thymus. Im Kortex des Thymus erfolgt die Ausreifung des T-Zell-Rezeptors (TCR) sowie die Expression von CD4 und CD8. Hier findet, vermittelt durch die Thymusepithelzellen, ortsständigen Makrophagen und dendritischen Zellen, die Proliferation sowie die Positiv- und Negativselektion der T-Zellen statt (*Sahle et al. 2001; Abbas et al. 2000; Roit et al. 1995*). Für die Entwicklung der T-Zellen ist insbesondere der Kontakt mit HLA-exprimierenden Thymusepithelzellen sowie deren Zytokinmuster und Wachstumsfaktoren (insbesondere IL-7) wichtig. Ein besonderes Merkmal der T-Zell-Reifung ist die hohe Zahl an apoptotischen T-Zellen aufgrund fehlender Expression bestimmter Antigenrezeptoren, Versagen der Positivselektion oder erfolgreicher Negativselektion infolge Erkennung von „Selbstantigenen“.

Die Positivselektion garantiert, dass die entstehenden reifen T-Zellen in der Lage sind, ihr eigenes HLA-Muster zu erkennen. Die Negativselektion verfolgt das Ziel, jegliche T-Zellen, die mit hoher Affinität körpereigene Peptide erkennen und damit potentiell autoreaktiv sind, zu eliminieren.

Ergebnis der Ausreifung ist eine gegenüber Autoantigenen tolerante und eine individualspezifische antigenspezifische Immunantwort initiiierende CD4<sup>+</sup>- oder CD8<sup>+</sup>-T-Zelle.

Die ausgereiften T-Zellen treten in die Blutbahn über und besiedeln die sekundären Lymphorgane. Dort ist der prädominante Ort der Sensibilisierung der T-Zellen gegenüber neuen Antigenen, desweiteren befinden sich hier antigen-präsentierende Zellen (APC; z.Bsp. Makrophagen, dendritische Zellen und B-Zellen) in einem besonderen Mikromilieu (*Gunn et al. 1999*).

Es treffen die T-Zellen mittels ihres TCR auf spezifische Antigene. Anzumerken ist, dass der TCR keine strukturelle Determinante bzw. Epitope

erkennt in ihrer nativen Form, sondern durch antigen-präsentierende Zellen proteolytisch aufbereitete Peptidfragmente des Antigens, die durch den Hauptgewebeverträglichkeitskomplex Klasse II (MHC Klasse II; major histocompatibility complex) an der Oberfläche der APC präsentiert wird. Dieser Prozeß der Aufbereitung des Antigens durch antigen-präsentierende Zellen wird Antigenprozessierung (antigenprocessing) genannt.

Extrazelluläre Antigene wie z. Bsp. Bakterien werden durch die APC aufgenommen und durch den MHC Klasse II an ihrer Oberfläche präsentiert. Dieser Komplex wird durch  $CD4^+$  T-Zellen, so genannte T-Helfer-Zellen, erkannt. Diese T-Helfer-Zellen aktivieren durch direkte Zellinteraktionen und Ausschüttung von Zytokinen Makrophagen und B-Zellen.

Die  $CD4^+$  T-Zellen werden in  $T_H1$  und  $T_H2$  unterschieden.  $T_H1$  spielen eine wichtige Rolle in der Makrophagenaktivierung,  $T_H2$  sind für die Aktivierung der B-Zellen zur Plasmazelle und anschließenden Antikörperproduktion unerlässlich.

Intrazelluläre Antigene wie sie durch die Infektion einer Zelle mit Viren oder obligat intrazellulärer Pathogene oder durch Tumorantigene entstehen, werden nach intrazellulären proteolytischen Abbau durch den MHC Klasse I präsentiert und durch  $CD8^+$  T-Zellen (auch zytotoxische T-Zellen) erkannt. Es erfolgt eine direkte Zerstörung der Zelle. Der MHC Klasse I ist in unterschiedlich starken Expression auf allen kernhaltigen Zellen vorhanden. Durch zahlreiche kostimulatorisch wirkenden Oberflächenmoleküle erfolgt zusammen mit dem MHC die Aktivierung der T-Zellen und die Einleitung einer Immunantwort.

### 1.1.3 Die Entwicklung der murinen B-Zellen

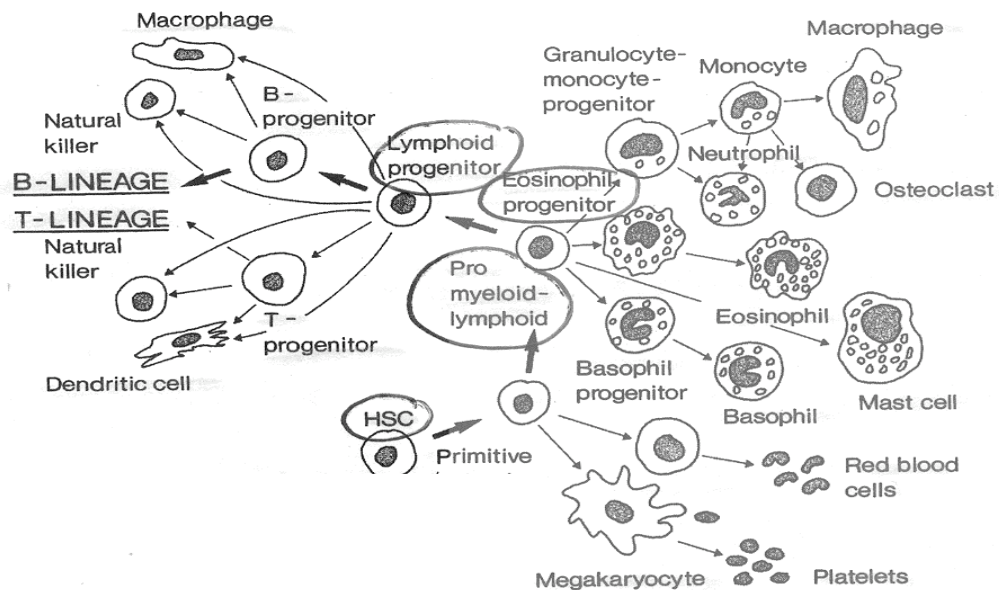
Die B-Zellen entwickeln sich aus einer gemeinsamen pluripotenten Stammzelle (*hematopoietic stem cell*: hämatopoetische Stammzelle: HSC) im Knochenmark (*Keller et al. 1985*), präpartal jedoch auch extramedullär in der fetalen Leber. Aus dieser entwickelt sich eine myeloid-lymphoide Vorläuferzelle sowie Vorläuferzellen für die Erythropoese und Thrombocytopoese (*Melchers et al. 1999*) (*Abb. 1.1*). Anhand des Nachweises bestimmter Differenzierungsmerkmale an der Oberfläche der

Zellen (CD-Marker; *cluster of differentiation*) durch FACS können die unterschiedlichen Entwicklungsstadien in der B-Zell-Lymphopoese bestimmt und nachvollzogen werden (*Rolink et al. 1993/1996; Hardy et al. 1991/1995*). Diese CD-Marker sind Membranproteine mit unterschiedlichen Funktionen für Adhäsion, Proliferation, Stimulation für spezifische Zellaktivitäten wie Migration der Leukozyten und Phagozytose (*CD-charts, PharMingen 2002*).

Die lymphoiden Vorläuferzellen exprimieren an ihrer Oberfläche schon früh CD135 und CD34 als Marker, so dass diese zu detektieren sind. CD135 (Synonym: Flk-2/ Flt3, Ly-72) ist ein Rezeptorprotein mit intrazellulären Tyrosinkinase- Domäne (*Matthews W. et al. 1991*). Es umfasst die Regulation, Proliferation und Überleben sowie die Differenzierung der hämatopoetischen Stammzellen über seinen Liganden Flt3 (*Lyman S.D. et al. 1993; Hannum C. et al. 1994; Veiby O.P. et al. 1996*).

CD34 ist ein Glykoprotein an der Zelloberfläche unreifer Vorläuferzellen im KM (*Morel F. et al. 1996; Osawa M. et al. 1996*), dessen Ligand L-Selektin ist. Der CD34- Marker erfasst auch die sehr frühen CD135<sup>-</sup> Stammzellen im adulten KM.

Die Entwicklung der B-Zellen im KM aus diesen lymphoiden Vorläuferzellen umfasst mehrere Stadien. Diese sind durch eine Umordnung der Gene für die leichte (L)- und schwere (H)- Kette (auch  $\mu$ -Kette genannt) der Immunglobuline sowie eine stetigen Änderung ihrer intrazellulären und extrazellulären Oberflächen-Marker, ihrer gebundenen Oberflächen-Immunglobuline und ihres Zellzyklus definiert (*Roit et al. 1995; Melchers et al. 1999, Rolink et al 1993/ 1996; Janeway et al. 1995*).



**Abbildung 1.1: Übersicht der Zellentwicklung im Knochenmark aus hämatopoetischen Stammzellen**

Diese Übersicht verdeutlicht die Entwicklung aller Blutzellen aus einer pluripotenten Stammzelle (HSC). Über einen myeloid-lymphoiden und lymphoiden Vorläufer entwickeln sich die B-Zellen durch spezifische stadienhafte Veränderungen des Expressionsmuster ihrer intrazellulären und extrazellulären Oberflächenmarker (*modifiziert nach Melcher et al. 1999*)

Die Entwicklung der B-Zellen über mehrere Stufen ist charakterisiert durch eine Kaskade von irreversiblen Differenzierungsstufen (*Melchers et al. 1999*) (*Tab. 1.1*). Die Bezeichnung der B-Zell-Vorstufen bezieht sich auf das System von Fritz Melcher und Antonius Rolink aus *Fundamental Immunology von 1999* (*Tab. 1.1*).

Das früheste Stadium der B-Zell-Entwicklung stellt die Prä-Pro-B-Zelle ( $CD45R^+$  /  $CD19^-$  /  $CD25^-$  /  $CD117^+$  /  $CD135^+$  /  $CD127^+$ ) dar, die sich unmittelbar aus der lymphoiden Vorläuferzelle ( $CD135^+$  /  $CD34^+$  /  $CD45R^-$ ) entwickelt. In diesem Stadium beginnt die Umordnung (Rearrangement) der Gene für die schwere Kette (H-Kette) der Immunglobuline. Insbesondere sind hier RAG-1 und -2 und TdT zu nennen. Die Aktivität dieser Gene kodiert die schwere Kette des antigenspezifischen Rezeptorkomplexes auf den Vorläufer- sowie unreifen und reifen B-Zellen (*Melcher et al. 1999*). Insbesondere über Zell-Zell-Kontakt durch die KM-Stromazellen, vermittelt durch CD117 (c-kit), und Zytokine, in erster Linie IL-7 an den IL-7-Rezeptor CD127 (*Winkler et al. 1994*) (*Abb. 1.6*), wird diese Aktivität und der Stimulus zur Differenzierung vermittelt. Des weiteren werden durch diese Signale und Kontakte noch weitere signaltransduzierende Moleküle und Rezeptoren exprimiert.

In der Prä-Pro-B-Zelle und in der Pro-B-Zelle (CD45R<sup>+</sup>/ CD19<sup>+</sup>/ CD25<sup>-</sup>/ CD117<sup>+</sup>/ CD135<sup>-</sup>/ CD127<sup>+</sup>) wird erfolgt die initiale D<sub>H</sub>J<sub>H</sub>- Verknüpfung. Die endgültige Verknüpfung des V<sub>H</sub>D<sub>H</sub>J<sub>H</sub>- Komplexes geschieht in den Prä-B-I-Zellen (CD45R<sup>+</sup>/ CD19<sup>+</sup>/ CD25<sup>-</sup>/ CD117<sup>+</sup>/ CD135<sup>-</sup>/ CD127<sup>+</sup>). Es resultiert die Expression der schweren Kette (H), die sich mit einer sogenannten Surrogat-L-Kette (Ersatz-L-Kette) zu einem Prä-B-Zell-Rezeptor (Prä-BCR) verbindet (*Melcher et al. 1999; Horne et al. 1996, Winkler et al. 1995*), über welchen zytokinvermittelte Stimuli die weitere Proliferation und Differenzierung sowie auch Positivselektion bedingt werden (*Hardy et al 1991; Rolink et al 1994; Winkler et al 1997*). In der Prä-B-II-Zelle (CD45R<sup>+</sup>/ CD19<sup>+</sup>/ CD25<sup>+</sup>/ CD117<sup>-</sup>/ CD135<sup>-</sup>/ CD127<sup>+/-</sup>), unterschieden in große (CD127<sup>+</sup>/ CD40<sup>-</sup>) und kleine (CD127<sup>-</sup>/ CD40<sup>+</sup>) erfolgt die Umordnung der leichten Kette (L-Kette). Während die große Prä-B-II-Zelle noch durch IL-7 stimuliert wird, wird die kleine Prä-B-II-Zelle über CD40 mittels gp39 (CD154/ Ly-62) stimuliert, zudem haben beide im Ggs. zu ihren Vorläufern einen IL-2-Rezeptor (CD25) ausgebildet.

Nach Abschluß des Umordnungsprozesses der schweren und leichten Kette exprimiert die B-Zelle nun IgM auf ihrer Oberfläche als unreife B-Zellen (CD45R<sup>+</sup>/ CD19<sup>+</sup>/ CD25<sup>+</sup>/ CD117<sup>-</sup>/ CD135<sup>-</sup>/ CD127<sup>-</sup>/ CD40<sup>+</sup>/ IgM<sup>+</sup>/ IgD<sup>-</sup>). Dieser dient unter anderem zur Negativ-Selektion der B-Zellen auf Autoantigene im KM und nach Auswanderung in der Milz (*Gay et al. 1993; Radic et al. 1996; Lang et al 1996; Chen et al. 1997*). Im Rahmen der Negativselektion im KM erfolgt die Deletion und ein Arrest in der weiteren Differenzierung der B-Zellen, in der Milz erfolgt bei Reaktion auf Autoantigene die klonale Anergie. Die reifen B-Zellen exprimieren neben IgM auch IgD als *naïve B-Zellen*. Nach Aktivierung durch ein spezifisches Antigen proliferieren diese naiven B-Zellen (klonale Proliferation) und differenzieren sich zu antikörperproduzierende Plasmazellen, zudem entstehen auch Gedächtniszellen.

Während ihrer Ausreifung und Differenzierung im KM erfolgt eine enge Interaktion mit den Stromazellen des KM über Zell-Zell-Kontakte und eine Stimulation durch Zytokine sowie eine Migration der B-Zellen vom Endosteum zu den Sinusoiden, wo sie in die Blutbahn als unreife oder reife B-Zellen übertreten (*Abb. 1.2*).

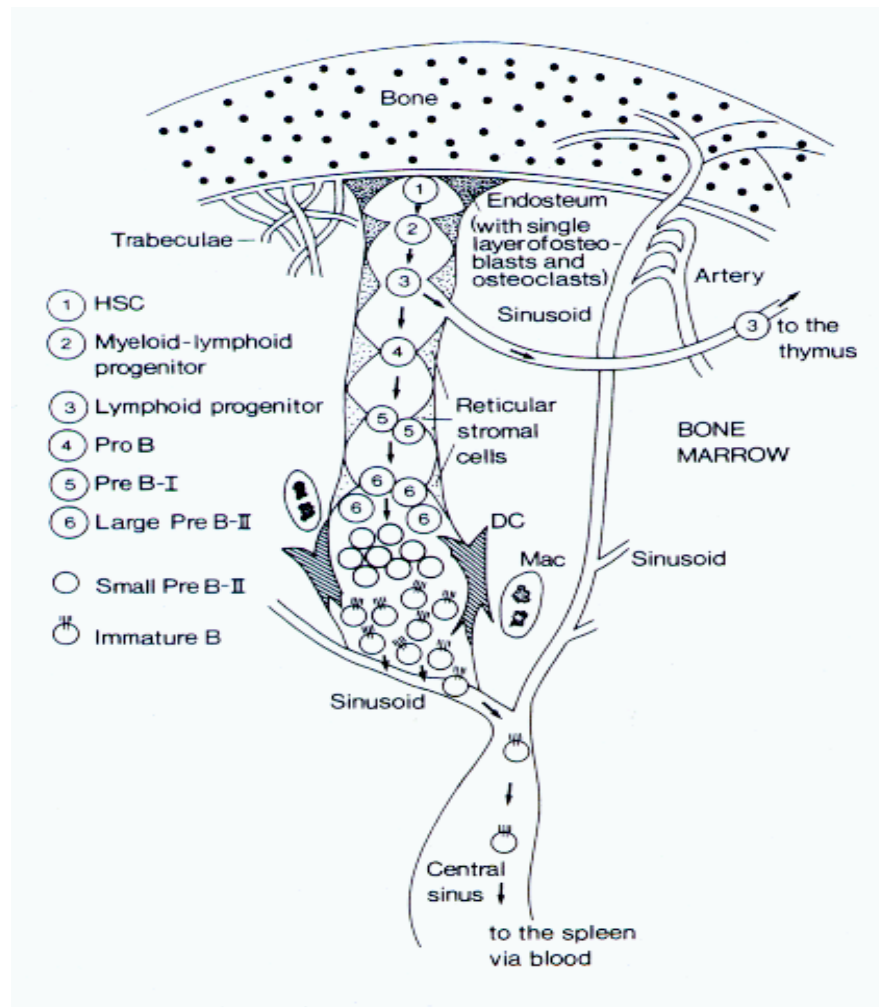
Marker	Lymphoide Vorläuferzelle	Prä-Pro-B-Zelle	Pro-B-Zelle	Prä-B-I-Zelle	Prä-B-II-Zelle		Unreife B-Zelle	Reife B-Zelle
					Groß	klein		
CD45R (B220)	Ø	+	+	+	+	+	+	+
CD19 (B4)	Ø	Ø	+	+	+	+	+	+
CD25 (IL-2-R.)	Ø	Ø	Ø	Ø	+	+	+	Ø
CD34	+	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø
<b>Zytokin-Rezeptor</b>								
CD117 (c-kit)	Ø	+	+	+	Ø	Ø	Ø	Ø
CD135 (Flk-2)	+	+	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø
CD40 (gp39-R.)	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	+/Ø	+	+
CD127 (IL-7-R)	Ø	+	+	+	+	Ø	Ø	Ø
<b>Rearrangement</b>								
RAG-1	Ø	+	+	+	+	+	+/Ø	Ø
RAG-2	Ø	+	+	+	+	+	+/Ø	Ø
TdT	Ø	+	+	+	Ø	Ø	Ø	Ø
<b>Gene der H-Kette</b>	N.R.	D <sub>H</sub> - J <sub>H</sub>	D <sub>H</sub> - J <sub>H</sub>	V <sub>H</sub> -D <sub>H</sub> J <sub>H</sub>	V <sub>H</sub> D <sub>H</sub> J <sub>H</sub>	V <sub>H</sub> D <sub>H</sub> J <sub>H</sub>	V <sub>H</sub> D <sub>H</sub> J <sub>H</sub>	V <sub>H</sub> D <sub>H</sub> J <sub>H</sub>
<b>Gene der L-Kette</b>	N.R.	N.R.	N.R.	N.R.	(N.R.)	V <sub>L</sub> J <sub>L</sub>	V <sub>L</sub> J <sub>L</sub>	V <sub>L</sub> J <sub>L</sub>
<b>Oberflächen-Immungl.</b>								
IgD	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	+
IgM	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	+	+
Surrogat-L-Kette	Ø	Ø	(+)	+	+	Ø	Ø	Ø

**Tabelle 1.1: Expression verschiedener B-Zell-Marker in Abhängigkeit ihrer Differenzierungsstadiums**

Diese Tabelle beschreibt schematisch die Ausprägung verschiedener Oberflächenmarker und Zytokinrezeptoren sowie den Status des Rearrangement der Gene für die schwere (H) und leichten (L) Kette der Immunglobuline. Mit der Expression einer sogenannten Surrogat-L-Kette (Ersatz-L-Kette) wird zusammen mit der  $\mu$ -Kette ein Prä-B-Zell-Rezeptor (Prä-BCR) exprimiert bevor die Umordnung der Gene für die Leichtkette der Immunglobuline beendet wird. Dieser dient zur weiteren Proliferation und Differenzierung der B-Zellen.

**N.R.** (*no rearrangement*) bedeutet, dass die Gene noch nicht umgeordnet sind. Bemerkenswert ist die unterschiedliche Exprimierung von Zytokinrezeptoren in Abhängigkeit von Differenzierungsgrad der B-Zellen. Diese Zytokine, insbesondere IL7 sowie zu Beginn Flk-2, werden von den Stromazellen im KM sezerniert und tragen damit wesentlich zur Ausreifung der B-Zellen bei. Desweiteren besteht ein Zell-Zell-Kontakt mit diesen Stromazellen, z.Bsp. über CD117 (c-kit) (*modifiziert nach Melcher F. und Rolink A. 1999*).





**Abbildung 1.2: Differenzierung und Migration der B-Zellen im Stroma des KM's**

In dieser schematischen Darstellung wird die Interaktion der B-zellen mit den Stromazellen des KM's deutlich. Diese erfolgt über Zell-Zell-Kontakte (CD117, c-kit) und Zytokine (IL-3, IL-7, Flt-3, IL-2). Nummer 3 bezeichnet die myeloid-lymphoiden Vorläuferzellen, die zum Teil zur weiteren T-Zell-Entwicklung in den Thymus auswandern. Makrophagen (MAC) phagozytieren die apoptotischen B-Zellen, dendritische Zellen (DC) interagieren mit dem BCR zur Positiv- oder Negativ-Selektion der B-Zellen. Es folgt während des Differenzierungsprozesses eine Migration in Richtung der Sinusoide des Knochens, durch die letztendlich der Übertritt unreifer oder reifer B-Zellen in den zentralen Blut- Kreislauf bis zur Milz erfolgt (nach Melcher und Rolink 1999).

## 1.2 Die Neurotrophine

Die Entwicklung und das Überleben des Nervensystems der Wirbeltiere ist abhängig von der Gegenwart löslicher neurotropischer Faktoren (Barbacid et al. 1994; Levi-Montalcini et al. 1987; Oppenheim et al. 1991; Heumann et al. 1994; DiCicco-Bloom et al. 1993). Diese Faktoren werden durch die Zielzellen selbst oder den umgebenen Stromazellen sezerniert. Im Laufe der neuroimmunologischen Forschung wurden eine Reihe weiterer Funktionen und Wirkungen dieser Faktoren auf das Nervensystem bekannt wie die

Induktion der Axonsprossung (*Heumann et al. 1994*) Motoneuron-Entwicklung und -Sprossung (*Wiese et al. 1999*), Stimulation und Entwicklung der Glia-Vorläuferzellen (*Barres et al. 1994*), Schutz vor toxischen Zellschaden, z.Bsp. Glutamat- induzierte Neurotoxizität (*Lindholm et al. 1993*), sowie Modulation der Proteinexpression an der Zelloberfläche und der synaptischen Funktion (*Korsching et al. 1993; Davies et al. 1994*). Zudem sind weitere Funktionen im Nervensystem bekannt, die über einen reinen trophischen Effekt hinausgehen: so konnte nachgewiesen werden, dass Neuriten auf eine Neurotrophinquelle hinwachsen. Damit wirken Neurotrophine auch als Chemotaxis auslösendes Cytokin (*Gundersen et al. 1979*).

Daneben sind eine Reihe von Funktionen der Neurotrophine im Rahmen neurologischer Pathologien und Erkrankungen. So zeigt BDNF einen neuroprotektiven Effekt in Multiple-Sklerose-Läsionen im Gehirn (*Stadelmann et al. 2002; Kerschensteiner et al. 1999*).

Im Rahmen peripherer Neuropathien zeigt sich ein Anstieg der mRNA für Neurotrophine und deren Rezeptoren in den geschädigten Nerven (*Sobue et al. 1998*). Desweiteren wurde eine Rolle der Neurotrophine bei Morbus Alzheimer (*Salehi et al 2004*) und Morbus Parkinson (*Nagatsu et al. 2000*) entdeckt.

Interessanterweise findet sich außerhalb des Nervensystems auch auf Zellen des Immunsystems und des KM (*Labouyrie et al. 1999/ 1997*) und sogar im Rahmen der Frakturheilung auf Osteoblasten und hypertrophen Chondrozyten (*Asaumi et al. 2000*) einen Einfluß der Neurotrophine und eine Expression der Neurotrophine sowie deren Rezeptoren auf diesen Zellen.

In den letzten Jahren wurde eine Reihe von Interaktionswege von Nerven- und Immunsystem über Neurotrophine entdeckt (*Otten et al. 1995*). Neurotrophine spielen eine wichtige Rolle im physiologischen und pathophysiologischen Ablauf der Entwicklung der Immunzellen im KM (*Labouyrie et al. 1999*) und der Immunreaktion wie Asthma bronchiale (*Braun et al. 2001; Nockher et al. 2006; Renz et al. 2001*) sowie Tumorerkrankungen der Immunzellen wie das Hodgkin-Lymphom und das B-Zell-Lymphom (*Labouyrie et al. 1997*).

### 1.2.1 Die Mitglieder der NT-Familie

Das erste entdeckte Neurotrophin war NGF (*nerve growth factor*) in den 50er Jahren (*Levi-Montalcini et al. 1956/ 1987*). Es wurde damals unter diesem Faktor eine Aussprossung von Nervenaxonen von sympathischen und sensiblen Nervenzellen nachgewiesen. Daneben wurden im Laufe der Zeit weitere Faktoren entdeckt.

BDNF (*brain- derived neurotrophic factor*) induziert die Neuropeptidsynthese in den Neuronen (*Barde et al. 1982; Leibrock et al. 1989; Zhang et al. 1995*), sowie bedingt es das Überleben, die Differenzierung und das Aufrechterhalten einer physiologischen Funktion und Aktivierung der meisten Nervenzellen (*Lewin et al. 1996; Barde et al. 1987*).

NT-3 (*neurotrophine-3*) (*Ernfors et al. 1990; Hohn et al. 1990, Maisonpierre et al. 1990; Rosenthal et al. 1990*) und NT-4 (*neurotrophin-4*), auch NT-5 bzw. NT-4/5 genannt (*Ip et al. 1992; Berkenmeier et al. 1991; Lindsay et al. 1994*) haben ebenfalls einen essentiellen Einfluß auf die Differenzierung, Entwicklung und Aktivierung des Nervensystems. Weitere Neurotrophine wie NT-6 und -7 (*Gotz et al. 1994; Nilsson et al. 1998*) wurden bisher nicht bei Vertebraten entdeckt.

Alle die oben genannten Neurotrophine (NGF, BDNF, NT-3, NT-4/5) wurden in der Milz und im Thymus nachgewiesen (*Hohn et al. 1990; Laurenzi et al. 1994*). Insbesondere wurde nachgewiesen, dass NGF einen Effekt auf die Differenzierung und Proliferation der B- und T-Zellen hat (*Thorpe and Perez-Polo 1987; Otten et al. 1989*). Zudem wurde ein Effekt auf Granulozyten (*Kannan et al. 1993*), Monozyten (*Erhard et al. 1993*) und Mastzellen (*Aloe et al. 1988*) nachgewiesen. Damit ist die Wirkung und Expression der Neurotrophine nicht auf das Nervensystem beschränkt.

Alle Neurotrophinfaktoren werden in Form als Vorläufer- Neurotrophine mit einem Gewicht von ca. 30 – 37kDa produziert und an bestimmten prädisponierten Schnittstellen von spezifischen Konvertasen in die eigentlichen Neurotrophinen mit ca. 13 – 16kDa gespalten (*Chao et al. 2002*). Diese „reifen“ Neurotrophine bilden nichtkovalent gebundene Homodimerpeptide, die an eine cystein- reichen Domäne der Neurotrophin-

Rezeptoren binden und den Effekt in der Zielzelle bewirken (*Barbacid et al. 1994; Heumann et al. 1994; Wiesmann et al. 2001*).

### 1.2.2 Die Neurotrophin – Rezeptoren

Es bestehen Familien von Neurotrophin- Rezeptoren, über die NT ihre Signale vermitteln: die trk- und die p75<sup>NTR</sup>-Familie.

Die trk- Rezeptoren (Tyrosinkinase-Glykoprotein-Rezeptoren: trkA, trkB und trkC), welche spezifisch bestimmten Neurotrophin- Liganden binden mit hoher Affinität ( $K_D$  ca.  $10^{-11}M$ ) (*Heumann et al. 1994*). Dabei bindet NGF an trkA, BDNF und NT-4/5 an trkB (*Berkemeier et al. 1991; Klein et al. 1989; Ip et al. 1992*) und NT-3 an trkC (*Dechant et al. 1994; Lamballe et al. 1991; Kaplan et al. 2000*). Zudem interagiert NT-3 in höheren Konzentrationen auch mit trkA und trkB (*Klein et al. 1991; Glass et al. 1993; Barbacid et al. 1994/ 1993*). NT-4/5 bindet mit geringer Spezifität auch an den trkA-Rezeptor (*Klein et al. 1992*). Es sind verschiedene Funktionen der trk-Rezeptoren bekannt. Sie vermitteln die differenten Neurotrophinwirkung auf die Zielzelle und umfassen Überleben, Apoptose, Differenzierung und Proliferation der Zelle. (*Barde et al. 1987; Heumann et al. 1994*). Dabei werden unterschiedliche selektive und spezifische Wirkungen über dieselben Neurotrophinrezeptoren ausgelöst in Abhängigkeit der jeweiligen Neurotrophinen, der vorliegenden Rezeptorexpression- Isoformen durch unterschiedliche Ausprägung intra- und extrazellulärer Domänen durch alternatives Splicing (*Barbacid et al. 1994*) und Interaktionen zwischen den verschiedenen Rezeptoren, wodurch die Neurotrophinwirkung moduliert wird (*Heumann et al. 1994; Friedmann et al. 1999*).

Die trk- Rezeptoren sind strukturell sehr ähnlich aufgebaut. Die Sequenzhomologie der unterschiedlichen trk- Rezeptoren im Hinblick auf ihre intrazelluläre Domäne beträgt ca. 85 – 90%, während die Sequenzhomologie der extrazellulären Domäne nur ca. 30% beträgt. Die Spezifität der einzelnen trk- Rezeptoren ist durch ihre extrazellulären Regionen definiert (*Ufer et al. 1998; Barbacid et al. 1994*)

Die trk- Rezeptoren werden in verschiedenen Isoformen produziert. Diese entstehen durch alternatives Splicing der extra- und intrazellulären Domäne. Dabei bedingen Isoformen der extrazellulären Domäne eine veränderte Affinität und somit Spezifität zu den Neurotrophinen, Isoformen der cytoplasmatischen intrazellulären Domäne weisen Veränderungen des katalytischen Zentrums der Tyrosinkinase oder gar keine Tyrosinkinaseaktivität auf und nehmen somit nicht an dem herkömmlichen Signalweg teil (*Barbacid et al. 1994*).

Zudem enthält die extrazelluläre Domäne zahlreiche Glykosylierungsstellen. Es konnte gezeigt werden, dass aktivierte trk- Rezeptoren, die unglykosyliert vorliegen, die Zellmembran nicht erreichen können. Man geht daher davon aus, dass die Glykosylierung für die Positionierung der trk- Rezeptoren in der Zellmembran und auch für die Verhinderung einer vorzeitigen Aktivierung der Neurotrophin- vermittelten Signalkaskade eine Bedingung darstellt (*Watson et al. 1999*).

Für trkA sind 2 Isoformen nachgewiesen worden mit 790 bzw. 796 Aminosäuren und einem Gewicht von ca. 140 kDa (*Meakin et al. 1992; Barbacid et al. 1994; Ultsch et al. 1999*).

Für trkB wurden zwei verschiedene Klassen detektiert: ein ca. 145kDa großes Membranmolekül mit katalytischer Domäne, der Tyrosinkinase, und ein ca. 95kDa großes Molekül (trkBpg95) ohne Tyrosinkinase-Domäne, also ohne intakten katalytischen Zentrum (*Klein et al. 1989/ 1990; Middlemas et al. 1991*).

Diese „beschnittene“ Form ist von den üblichen Signalwegen ausgeschlossen (*Barbacid et al. 1995; Kaplan et al. 1993*); es werden verschiedene Funktionen für diese Rezeptorform diskutiert: Inhibition der Neurotrophin- Signalwege (*Eide et al. 1996*), ein unabhängiger Signalweg (*Baxter et al. 1997*) und Interaktionen mit p75<sup>NTR</sup> (*Hapner et al. 1998*).

Für trkC wurden ebenfalls verschiedene – aktuell 4 verschiedene - Isoformen mit einem ungefähren Gewicht von ca. 145kDa beschrieben (*Lamballe et al. 1991/ 1993; Tsoulfas et al. 1993; Valenzuela et al. 1993*). Auch hier existiert ein trkC- Rezeptor ohne katalytische Domäne mit ca. 108kDa (*Tsoulfas et al. 1993; Barbacid et al. 1994*).

Der Aufbau aller trk- Rezeptoren ist bis auf die oben beschriebene Varianz durch die Isoformen gleich:

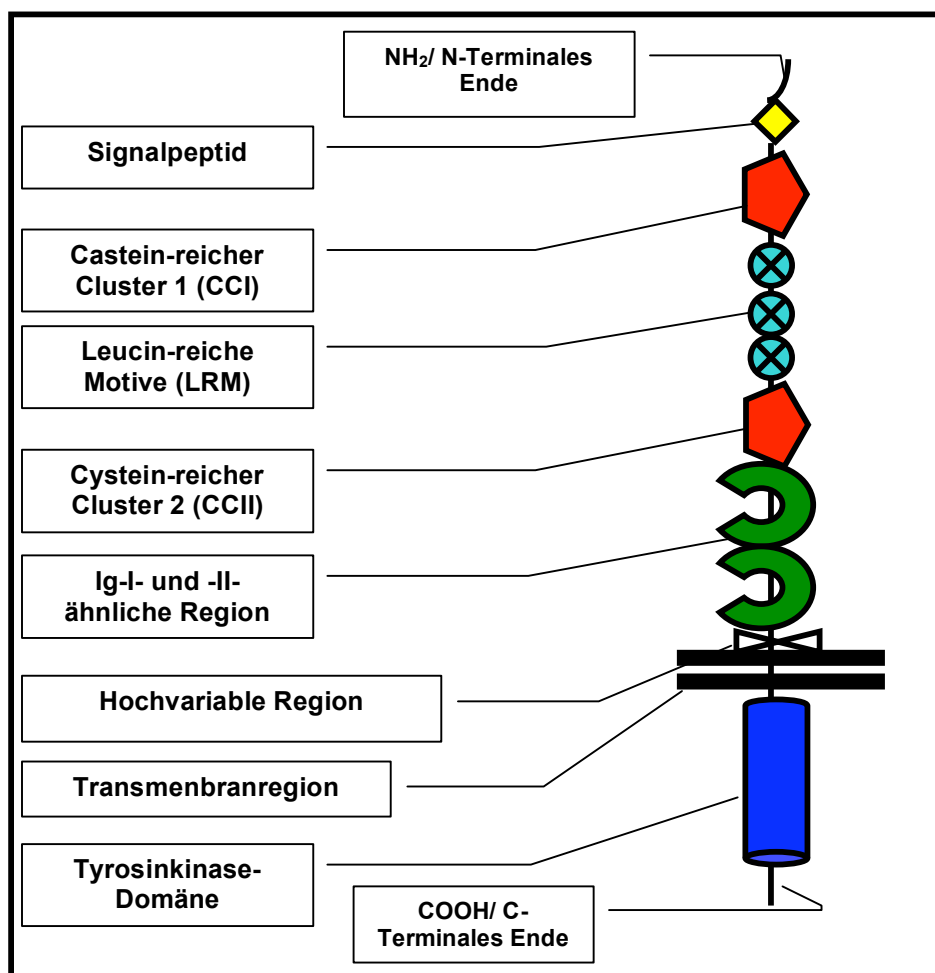
Diese bestehen am N-terminalen Ende aus einem Signalpeptid (SP, einer Region aus drei leucin-reichen Motiven (LRM) von jeweils 24 Aminosäuren, die flankiert wird von jeweils einem cystein-reichen Clustern (CCI, CCII), die für die Ligandenbindung verantwortlich sind. Es folgen dem zweiten cystein-reichen Cluster zwei Immunglobulin- ähnliche Regionen (Igl, IgII), vergleichbar mit anderen Tyrosinproteinkinase- Subfamilien wie PDGF und EGF. Dem schließt sich eine hochvariable Region aus unterschiedlichen Aminosäurenabfolgen und schließlich die Transmembran- Region an. Am cytoplasmatischen Ende ist dieser Transmembran- Region die katalytische Domäne, die Tyrosin- Protein- Kinase, angeschlossen mit einem ca. 15 Aminosäure langen C-terminalen Ende (*Martin-Zanca et al. 1989; Barbacid et al. 1994*) (Abb. 1.3).

Ein weiteres Rezeptormolekül ist der Pan-Neurotrophin- Rezeptor  $p75^{NTR}$ , mit einem Molekulargewicht von ca. 75 kDa, der mit niedrigerer Affinität ( $K_D$  ca.  $10^{-9}M$ ) als die trk- Rezeptoren alle Neurotrophine mit vergleichbarer Affinität und Spezifität bindet, da der Bereich für die  $p75^{NTR}$ -Bindung in allen Neurotrophinen hoch konserviert und damit vergleichbar ist (*Wiese et al. 1999; He et al. 2004*).

Er gehört zur Super- Familie der Tumornekrosefaktor (TNF)- Rezeptoren (TNF-Rezeptor I und II) (*Chao et al. 1994; Gentry et al. 2004*), der humanen FAS- Oberflächen- Antigenen und der lymphozytären CD40- / CD30- und OX40- Oberflächen- Antigenen (*Rabizadeh et al. 1993; Locksley et al. 2001*). Ihm wird einerseits über eigene, trk- unabhängige, Signaltransduktions-Mechanismen – ähnlich der Signaltransduktion von IL-1 und TNF- $\alpha$  - eine Modulation der Neurotrophinwirkung in der Zielzelle (*Dobrowsky et al. 1994*) und andererseits ein Effekt über eine Komplexbildung mit den trk- Rezeptoren zugeschrieben. Dies erklärt die bivalente Funktion und Neurotrophinwirkung (Apoptose und Überleben) des  $p75^{NTR}$  auf die jeweilige Zielzelle (*Verdi et al. 1994; Barker et al. 1994; Hantzopoulos et al. 1994*).

Die extrazelluläre Domäne des  $p75^{NTR}$ - Rezeptors beinhaltet am N-terminalen Ende vier cystein-reiche hochkonservierte Cluster, die wie bei den

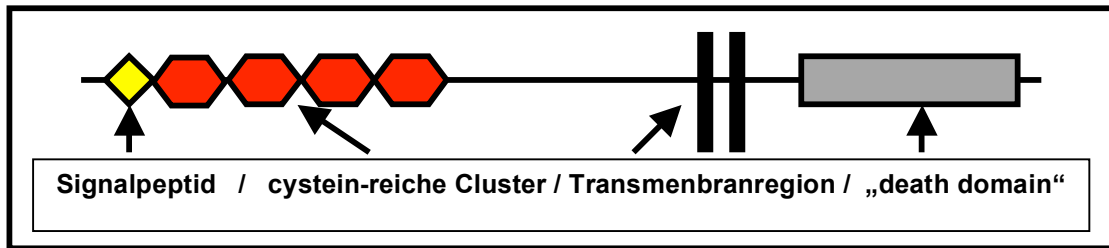
trk-Rezeptoren wesentlich für die Ligandenbindung sind (Baldwin et al. 1992; Bothwell et al 1995; Yan et al. 1991; Dobrowsky et al. 1995). Dabei scheint die zweite cystein-reiche Region bedeutend für die NGF- Bindung zu sein (Baldwin et al. 1995). Diese extrazelluläre Domäne ist überwiegend glykosyliert. Es folgt eine Transmembran- Region von ca. 22 Aminosäuren und eine cytoplasmatische Komponente von ca. 151 Aminosäuren. Diese cytoplasmatische Region beinhaltet nach heutigem Wissen keine katalytische Komponente. Am C- terminalen Ende zeigt sich in der Aminosäurenabfolge (ca. 80 Aminosäuren) eine strenge Homologie zur „Todesregion“ (Death-Domain) der TNF-Rezeptors und anderen proapoptischen Rezeptoren (Abb. 1.4). Hierüber interagieren proapoptische Proteine (Feinstein et al. 1995; Chapman et al. 1995).



**Abbildung 1.3: Schema des trk- Neurotrophin- Rezeptors.**

In dieser Übersicht zeigt sich der allgemeine Aufbau der trk- Rezeptoren, wie im Text erläutert. Die extrazelluläre Domäne ist durch die Abfolge eines Signalpeptides (SP), einer cysteinreichen Region (CCI), eines leucinreichen Motivs (LRM), einer zweiten cysteinreichen Region (CCII), sowie einer Ig-ähnlichen Domäne gekennzeichnet. Auf der

cytoplasmatischen Seite befindet sich das katalytische Zentrum der Tyrosinkinase (modifiziert nach Barbacid et al. 1994).

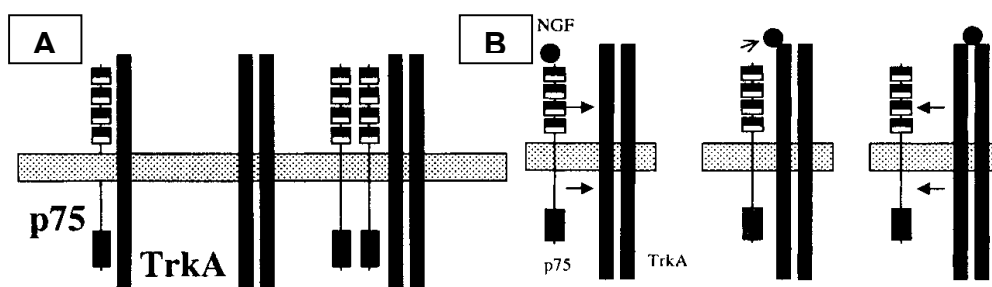


**Abbildung 1.4: Schema des p75<sup>NTR</sup>-Pan- Neurotrophin- Rezeptors**

Im Gegensatz zu den trk-Rezeptoren besitzt der p75- Rezeptor keine katalytische Domäne intrazellulär. Am C- terminalen Ende dominiert eine dem TNF- Rezeptor homologe „Todesdomäne“. Über die cystein- reichen Cluster erfolgt die Neurotrophinbindung, die im Ggs. Zu den trk- Rezeptoren für alle neurotrophine mit gleicher Affinität stattfindet (Modifiziert nach Barrett et al. 1999).

p75<sup>NTR</sup> bindet alle Neurotrophine mit derselben Affinität (Rodriguez-Tebar et al. 1990; Squinto et al. 1991). Es moduliert die Neurotrophinwirkung in den Zielzellen. Dabei scheint es unterschiedliche Interaktionen mit den trk-Rezeptoren zu geben. In den verschiedenen Modellen zur Interaktion wird eine Komplexbildung zu Oligomeren, zu Heterodimeren (Jing et al. 1992) und ein Rekrutierungsmodell (Chao et al. 1995) diskutiert (Abb. 1.5).

Beide Klassen der Neurotrophin- Rezeptoren sind essentiell für das Überleben und die regelrechte Ausdifferenzierung des Nervensystems. Dies konnte mit gen- mutierten Mausmodellen (so genannte knock-out- Mäusen) gezeigt werden (Snider et al. 1994; Smeyne et al. 1994).



**Abbildung 1.5: Interaktionsmodelle zwischen p75<sup>NTR</sup> und trk- Rezeptoren**

**A.** beschreibt die Interaktion zwischen p75<sup>NTR</sup> und z.Bsp. trkA durch die Bildung zu komplexen Heterodimeren oder Oligodimere im Vergleich zu einem Homodimer von trkA. Durch diese Komplexbildung verändert sich die Affinität der Rezeptoren zu den Neurotrophinen. Die Neurotrophinwirkung wird moduliert.

**B.** zeigt schematisch ein so genanntes Rekrutierungsmodell auf. Hierbei bindet p75<sup>NTR</sup> NGF und präsentiert dieses dem trkA- Rezeptor. Voraussetzung für dieses Modell ist die freie Beweglichkeit des p75<sup>NTR</sup> lateral in der Membran. Anzeichen für diese Art der Interaktion zwischen den verschiedenen Klassen für Neurotrophin- Rezeptoren wurden gemacht, als man in bestimmten Zelllinien (PC12) Beobachtungen machte, dass die NGF- Bindung durch trkA in Gegenwart von p75<sup>NTR</sup> höher ausfiel (Mahadeo et al. 1994) (nach Barrett et al. 1999).



### 1.2.3 Die Neurotrophin- Rezeptor vermittelte Signalkaskade

Durch die Bindung der Neurotrophine an ihren entsprechenden Rezeptor wird eine Kaskade unterschiedlicher intrazellulärer enzymatischer Wege aktiviert. Dabei werden Signalkaskaden der *trk*- Rezeptoren und des  $p75^{\text{NTR}}$  unterschieden.  $p75^{\text{NTR}}$  moduliert die *trk*- Signaltransduktion, hat jedoch auch eine eigene *trk*- unabhängige Signalkaskade (*Dobrowski et al. 1994*).

Die *trk*- vermittelte intrazelluläre Signalkaskade ist für die wesentlichen Neurotrophinfunktion von Bedeutung wie Differenzierung, Überleben, Proliferation und Aktivierung von Neuronen (*Heumann et al. 1994; Wiese et al. 1999; Barres et al. 1994; Lindholm et al. 1993; Korsching et al. 1993; Davies et al. 1994*).

Beide Rezeptorklassen aktivieren unabhängig von einander unterschiedliche Signalkaskaden (*Kaplan et al. 2000*). In Abwesenheit von Neurotrophinen werden die *trk*- Rezeptoren intrazellulär gespeichert. Durch Stimuli wie elektrische Aktivität, cAMP und  $\text{Ca}^{2+}$  werden die Rezeptoren an die Zelloberfläche befördert und vermitteln die Neurotrophinwirkung (*Heumann et al. 1994*).

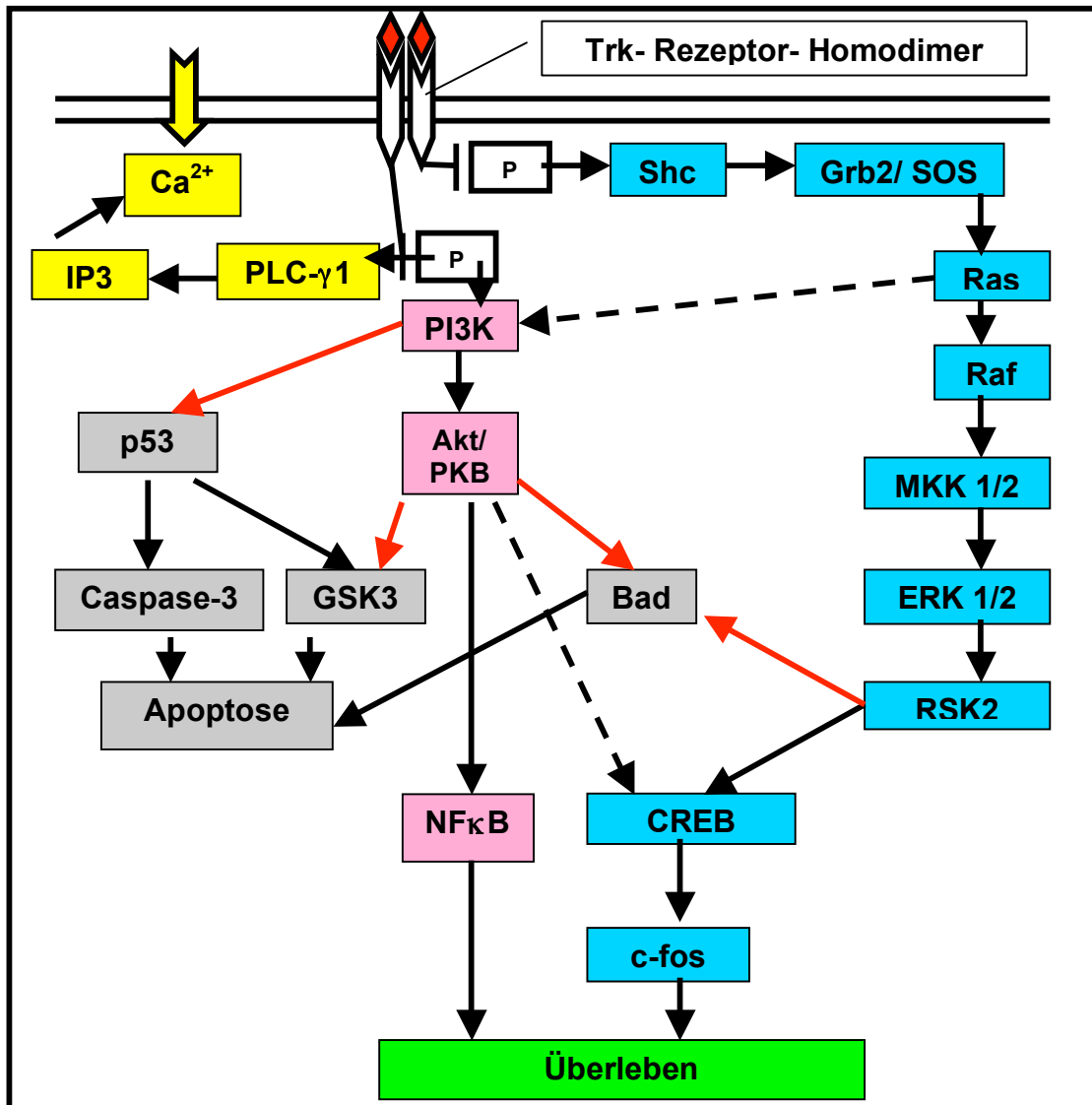
Die Aktivierung der *trk*- Rezeptoren durch seine spezifischen Liganden läuft für alle Tyrosin-Kinasen- Rezeptoren gleich ab:

Es kommt zu einer Neurotrophin- induzierten Dimerisierung der Rezeptoren und im weiteren zu einer Aktivierung der Kinasedomäne, welches in einer Phosphorylierung der Tyrosinreste innerhalb sogenannter „activation loops“ der intrazellulären Domäne führt (*Clary et al. 1994*). Dies bedingt eine weitere vollständige Aktivierung der Kinasedomäne und zu einer weiteren Tyrosinphosphorylierung weiterer Tyrosinreste außerhalb der „activation loops“ der intrazellulären Domäne. An bestimmte phosphorylierten Tyrosinreste, wie Tyr490, Tyr670, Tyr674 und Tyr785, lagern sich verschiedene Adapterproteine an, die die weitere intrazelluläre Signalkaskade vermitteln (*Heumann et al. 1994, Baxter et al. 1995*). Hierzu zählen drei verschiedene Wege: der Ras/ ERK- Weg, der PI3K/ Akt- Kinase- Weg und der PLC- $\gamma$ 1- Weg (*Abb. 1.6*).

Über Tyr490 erfolgt die Anlagerung und Phosphorylierung des Adapterproteins Shc (*Heumann et al. 1994; Stephens et al. 1994; Obermeier et al. 1994*). An das phosphorylierte Shc bindet ein weiteres Adapterprotein an (Grb2), welches wiederum einen so genannten SOS- Komplex aktiviert. Dies führt zu einer Aktivierung von Ras (*Basu et al. 1994; Heumann et al. 1994; Stephens et al. 1994; Hashimoto et al. 1994*). Ras ist eine GTPase, welche die Proteinkinase Raf aktiviert, die die MAPK-Kinase 1/2 (MKK 1/2) phosphoryliert und aktiviert. Diese Kinase phosphoryliert letztendlich ERK 1/2 (*Chuang et al. 1994*). Diese führt zu einer Aktivierung des RSK2- Komplexes (*Heumann et al. 1994; Bonni et al. 1999; Alessi et al. 1994*). RSK2 phosphoryliert Bad - ein proapoptotisches Molekül der Bcl2-Familie, welches im unphosphorylierten Zustand proapoptotische intrazelluläre Vorgänge auslöst - und inaktiviert dieses. Damit werden apoptotische Vorgänge verhindert und der Neurotrophin- vermittelte Effekt des Zellüberlebens begünstigt (*Datta et al. 1997*). Desweiteren phosphoryliert RSK2 CREB, welches die Transkription von antiapoptotischen Faktoren (z. Bsp. c-fos) vermittelt, welches letztendlich im Überleben der Zelle mündet (*Ginty et al. 1994*).

Der zweite trk- Rezeptor- vermittelte Signalkaskadepfad erfolgt über PI3K. PI3K kann über Ras oder über trk- Rezeptor direkt aktiviert werden. Die Aktivierung der PI3K führt zu einer Produktion von Phosphatidylinositol-3-Phosphat, was zu einer Aktivierung der Proteinkinase 3, auch Akt genannt, führt. Diese aktiviert weitere antiapoptotische Faktoren wie CREB aus dem vorher beschriebenen Ras/ERK-Weg und NFκB. Desweiteren werden proapoptotische Faktoren wie Bad GSK3 phosphoryliert und dadurch inaktiviert (*Heumann et al. 1994; Rodriguez-Viciana et al. 1994; Yuan et al. 2000*).

Der dritte Weg wird durch den phosphorylierten Tyrosinrest Tyr785 vermittelt, indem dort die PLC-γ1 gebunden und aktiviert wird. Es spaltet hydrolytisch Phosphatidylinositid- Verbindungen und führt damit zu einem Anstieg von 1,4,5-Inositol- Triphosphat (IP3). IP3 führt zu einem Anstieg von intrazellulären Ca<sup>2+</sup> und damit zu einer Aktivierung Ca<sup>2+</sup>-abhängiger Signalwege (*Heumann et al. 1994; Patapoutian et al. 2001*).



**Abbildung 1.6: Die trk- Rezeptor vermittelte Signalkaskade**

Dargestellt sind die verschiedenen Signalwege, die über die trk- Rezeptoren vermittelt werden. Ausgangspunkt ist die Tyrosinreste- Phosphorylierung durch die Neurotrophinbindung. Der blaue Pfad bezeichnet die Ras/ ERK- Signalkaskade, der rosa markierte Pfad den PI3K/ Akt- Kinase- Weg und der gelb markierte Weg den PLC- $\gamma$ 1- Weg. Grau bezeichnet den Weg der Apoptose. Die verschiedenen Interaktionen sind durch Pfeile markiert. Rote Pfeile bezeichnen eine Hemmung, schwarze eine Aktivierung. Die gestrichelten Pfeile zeigen Verbindungen zwischen unterschiedlichen Signalkaskadewege auf (modifiziert nach Heumann et al. 1994 und Yuan et al. 2000).

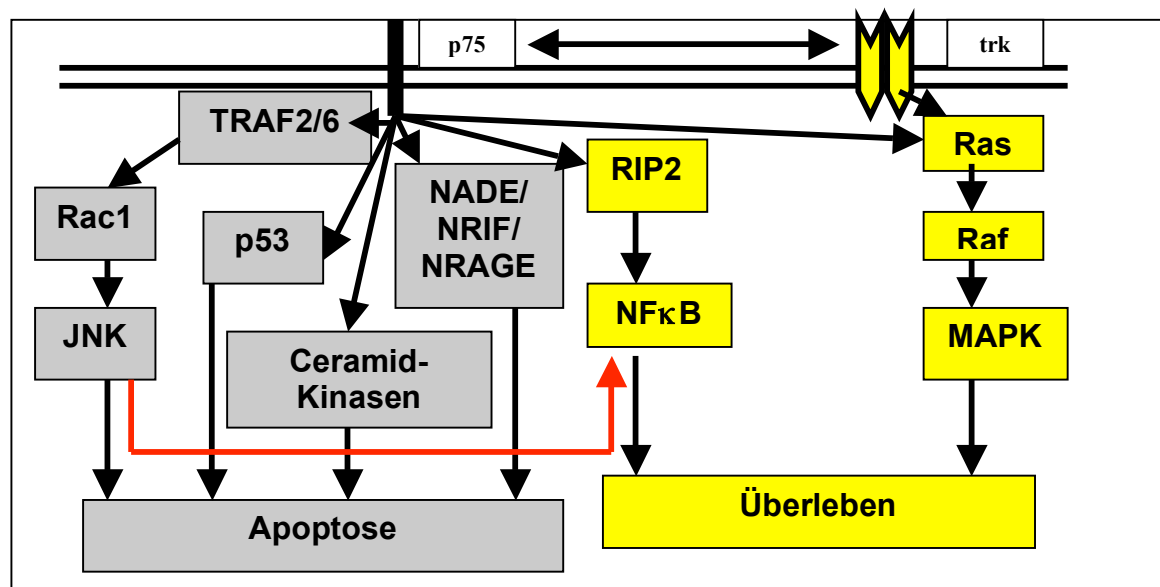
Der durch den  $p75^{\text{NTR}}$  aktivierten Signalweg kann die Apoptose der Zelle induziert werden (Heuman et al. 1994/ Barrett et al. 1999). Der  $p75^{\text{NTR}}$ -Rezeptor verfügt nicht über eine eigene Kinasedomäne. Die Signalkaskade wird daher durch Adapterproteine TRAF2 vermittelt (Barrett et al. 1999; Krajewska et al. 1998). Zudem existieren weitere Adapterproteine, die apoptotische und aber auch antiapoptotische Signale vermitteln (Abb. 1.7). Ein Weg der intrazellulären Signalkaskade ist der Ras-Raf-MAPK-Kinase

(Zhang et al. 1997), die letztendlich in antiapoptotische und proliferative Zellsignale endet. Diese Kaskade wird nur bei Vorliegen von trk- Rezeptoren in Gang gesetzt (Rabizadeh et al. 1993; Cotrina et al. 2000). In der Abwesenheit von trk- Rezeptoren werden im Falle einer Neurotrophinbindung apoptotische Signale intrazellulär vermittelt (Friedmann et al. 2000; Casaccia-Bonnet et al. 1996; Chao et al. 1998). (Abb. 1.8).

Die apoptotische Signalkaskade wird durch die Adapterproteine vermittelt. Es kommt zur Aktivierung der JNK, die proapoptotische Transkriptionsfaktoren wie c-jun, ATF2 und Elk-1 phosphoryliert und aktiviert und damit den Zelltod einleitet (Derijard et al. 1994; Galchevargova et al. 1994; Verheij et al. 1996). Die JNK wird auch SAPK genannt, eine durch Stress (wie Hitze, Ultraviolettes Licht, Hypoxie etc.) aktivierte Proteinkinase, die dann die Apoptose als Antwort auf einen starken Stressreiz auslöst. Weitere apoptotische Signalwege werden über p53, Ceramid-Kinasen (Barrett et al. 1999) und weitere Adapterproteine wie NRIF, NADE und NUAGE vermittelt.

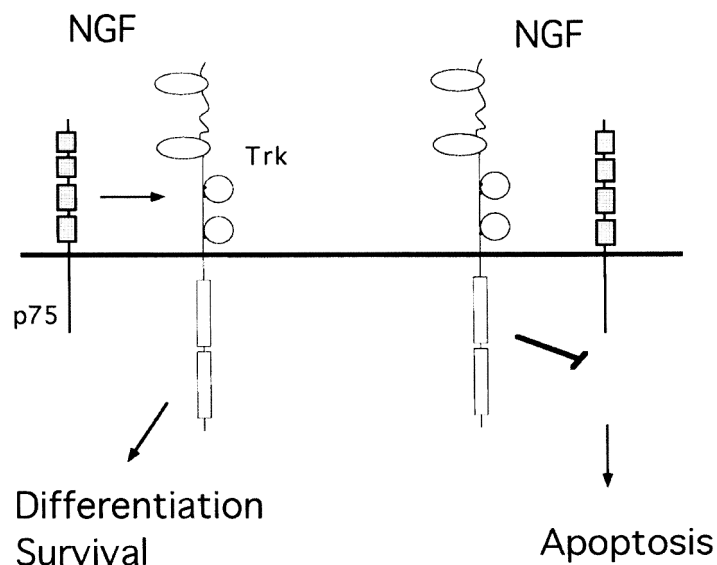
In Anwesenheit von trk- Rezeptoren werden antiapoptotische Signalwege über RIP2 und NF $\kappa$ B aktiviert (Carter et al. 1996; Gentry et al. 2000).

Letztendlich haben viele Untersuchungen die bivalente Funktion des p75<sup>NTR</sup> gezeigt: Überleben und Apoptose.



**Abbildung 1.7: Die p75<sup>NTR</sup>-vermittelte Signalkaskade**

Dieses Schema vermittelt die im vorangehenden Text erläuterte Signalwege. Hierbei zeigt sich die bivalente Funktion des p75<sup>NTR</sup>-Rezeptors bei Vorhandensein eines trk-Rezeptors (gelber Pfad) oder beim Fehlen eines solchen (grauer Pfad). Rote Pfeile bezeichnen einen inhibitorischen Weg (modifiziert nach Barrett et al. 1999).



**Abbildung 1.8: Mechanismen der Interaktion zwischen  $p75^{\text{NTR}}$  und  $\text{trk}$ - Rezeptoren und der resultierende Effekt (nach Chao et al. 1998)**

Dieses Schema zeigt die Modellvorstellung der unterschiedlichen Wirkung des  $p75^{\text{NTR}}$ -Rezeptors in Gegenwart des  $\text{trk}$ - Rezeptors (hier beispielsweise  $\text{trkA}$ ) auf. In Gegenwart von  $\text{trk}$ - Rezeptoren werden die Neurotrophinwirkungen durch eine erhöhte Affinität, vermittelt durch den  $p75^{\text{NTR}}$ , der Neurotrophine zu den  $\text{trk}$ - Rezeptoren verstärkt. Es resultiert eine Verstärkung der  $\text{trk}$ - vermittelten Signalkaskade, die in Proliferation, Differenzierung und Überleben mündet (Barker et al. 1994; Verdi et al. 1994; Lee et al. 1994). Die Gegenwart der  $\text{trk}$ - Rezeptoren wird die Signalkaskade, die in Apoptose endet unterdrückt (nach Chao et al. 1998).

#### 1.2.4 Die Rolle der Neurotrophine im Immunsystem

In den letzten Jahrzehnten wurden Interaktionen zwischen den Zellen des Immunsystems und des Nervensystems via Neurotrophine entdeckt. So wurden die Neurotrophine in KM, Thymus und Milz nachgewiesen (Hohn et al. 1990; Laurenzi et al. 1994; Labouyrie et al. 1999). Es werden Kontakte zwischen autonomen Nervenendigungen und Immunzellen angenommen (Mignini et al. 2003; Madden et al. 2000).

Darüber hinaus konnte auf den verschiedenen Immunzellen und die Immunzellen umgebenden Strukturzellen eine Neurotrophin- Synthese und Rezeptor- Expression nachgewiesen werden (Tab. 1.2), so dass auch auto- sowie parakrine Mechanismen diskutiert werden.

So wurde nachgewiesen, dass über  $\text{trkA}$  und  $p75^{\text{NTR}}$  via Neurotrophine die T-Zell- Differenzierung beeinflusst wird (Vega et al. 2004), dabei wird insbesondere von  $\text{CD4}^+$   $\text{T}_{\text{H}2}$ - Zellen NGF und  $\text{trkA}$  synthetisiert (Lambiase et al. 1997) bzw. exprimiert (Eberhard et al. 1993). Zudem wurde mittels knock-

out- Mausstämmen der Einfluß von NGF und BDNF auf die T-Zell-Entwicklung aufgezeigt (*Garcia-Suarez et al. 2000/ 2002*). Aktivierte T-Zellen exprimieren auch aktiv NGF und BDNF (*Kerschensteiner et al. 1999*), was für eine autokrine Stimulation sprechen würde.

In einer ausgedehnten Untersuchung nativer und maligner B- Zellen (*Laboury et al. 1997*) wurde nachgewiesen, dass alle trk- Rezeptoren durch B-Zellen exprimiert werden (*D'Onofrio et al. 2000; Schenone et al. 1996*). Andere Autoren zeigen lediglich eine Expression von trkA und p75<sup>NTR</sup> auf (*Torcia et al. 1996; Brodie et al. 1996*). Anscheinend ist die Expression der Neurotrophin- Rezeptoren und/ oder Neurotrophin- Synthese abhängig vom Differenzierungsgrad und/ oder Aktivierung der B-Zelle. Es konnte gezeigt werden, dass durch die Neurotrophine die Proliferation und Differenzierung und auch die Antikörpersynthese der B-Zellen induziert wird (*Otten et al. 1989; Kimata et al. 1991; Thorpe et al. 1987; Coppola et al. 2004*). Zudem wurde die Neurotrophin- Synthese von NGF, NT-3 und BDNF nachgewiesen (*Torcia et al. 1996; Kerschensteiner et al. 1999; Besser et al. 1999*). Autokrine Mechanismen werden diskutiert.

Eine Wirkung von NGF auf myeloide Vorläuferzellen im Hinblick auf die weitere Differenzierung und Proliferation und Ausreifung konnte aufgezeigt werden (*Mastuda et al. 1988*). Dabei konnten synergistische Effekte von NGF und des Granulozyten-Makrophagen-Kolonie-stimulierenden Faktor auf myeloider Vorläuferzellen dargestellt werden (*Tsuda et al. 1991; Chevalier et al. 1994*). Des Weiteren wurde der supportive Effekt von NGF auf die regelrechte Entwicklung von Vorläuferzellen im KM in Verbindung mit weiteren Stammzellfaktoren aufgezeigt (*Auffray et al. 1996*). Produktionsort sind die Stromazellen.

In anderen Zelllinien, wie basophile Granulozyten, Monozyten, Mastzellen und Fibroblasten konnte ebenfalls eine trk- Rezeptor- Expression (vor allem trkA) nachgewiesen werden (*Kannan et al. 1993; Ehrhard et al. 1993, Aloe et al. 1988; Tam et al. 1997; Otten et al. 1994; Micera et al. 2001*). Dabei konnte ein Einfluß von NGF auf die Degranulation und die Histamin-Sekretion von Mastzellen belegt werden (*Mazurek et al. 1986; Pearce et al. 1986; Tam et al. 1997*).

Fibroblasten (*Olgart et al. 2001*) und glatte Muskelzellen des Respirationstraktes (*Freund et al. 2002*) sowie aktivierte Mastzellen exprimieren selbst NGF (*Kanda et al. 2002*), was auf die Differenzierung und die Funktion der Mastzellen einen Einfluß haben soll (*Skaper et al. 2000; Xiang et al. 2000; Sawada et al. 2000*). Dies wäre zudem ein Beleg für einen autokrinen Mechanismus der Neurotrophine auf den Mastzellen.

Im Unterschied zu eosinophilen und neutrophilen Granulozyten, welche trkA und trkB (*Hamada et al. 1996; Kannan et al. 1991*) exprimieren, konnte eine trkB- und trkC- Expression in den basophilen Granulozyten nicht nachgewiesen werden (*Burgi et al. 1996*). Sie exprimieren trkA und werden durch NGF in ihrer Differenzierung und Leukotrien-C4- Produktion beeinflusst (*Bischoff et al. 1992*). Neutrophilen Granulozyten werden hinsichtlich ihrer Phagozytose- Bereitschaft und Superoxid- Produktion durch NGF stimuliert neben proliferativen und chemotaktischen Einflüssen (*Boyle et al. 1985; Kannan et al. 1991*).

Desweiteren synthetisieren auch eosinophile Granulozyten und Makrophagen NGF (*Otten et al. 1994; Noga et al. 2002*).

NT-3- Synthese wurde in eosinophilen Neutrophilen aufgezeigt (*Noga et al. 2003*).

TrkB und trkC in ihrer „beschnittenen Form wurden mittels Immunhistochemie in Makrophagen nachgewiesen sowie trkA in den Epithelzellen der murinen Lunge (*Hikawa et al. 2002*). Zudem wurde eine NGF- sowie eine BDNF- Produktion (*Braun et al. 2001*) in den Epithelzellen der murinen Lunge nachgewiesen.

Monozyten sezernieren BDNF und werden durch proinflammatorische Reize in der Produktion von BDNF hochreguliert (*Schulte-Herbruggen et al. 2005*). Makrophagen produzieren ebenfalls die Neurotrophine NGF, NT-4/5 und BDNF (*Caroleo et al. 2001; Braun et al. 1999*). Für Monozyten und Makrophagen wurde zudem eine chemotaktische Wirkung von NGF und NT-3 aufgezeigt (*Kobayashi et al. 2001*). Des Weiteren wurden antiapoptotische Effekte für NGF belegt (*la Sala et al. 2000*).

Zudem ließ sich neben der NGF- Synthese (*Marco et al. 1991; Pincelli et al. 1994*) auch der trkA- Rezeptor auf basalen Keratinozyten und gelegentlich

auch p75<sup>NTR</sup> nachweisen (Bull et al. 1998). Der NGF- Level korreliert mit der Entwicklung und Ausreifung der Keratinozyten (Bull et al. 1998).

Auch in Thrombozyten konnten Neurotrophine nachgewiesen werden, so fungieren sie als Speicherort für BDNF (Lommatzsch et al. 2005).

	NT	NT- Rezeptoren	NT- Effekte
<b>Fibroblast</b>	NGF	trkA	Differenzierung/ Proliferation
<b>Thrombozyten</b>	BDNF (gespeichert)	Ø	Speicherung von BDNF
<b>HSC</b>	Ø	trkA / p75 <sup>NTR</sup>	Differenzierung/ Proliferation/ Überleben/ Synergie mit Kolonie- stimulierenden Faktoren
<b>SMC der Lunge</b>	NGF/ BDNF	trkA/ trkB	Differenzierung/ Proliferation/ frgl. erhöhte Kontraktilität
<b>DC</b>	NGF/ BDNF	trkA/ B/ C/ p75 <sup>NTR</sup>	Proliferation/ Differenzierung/ Überleben
<b>Mastzelle</b>	NGF/ BDNF/ NT-3	trkA/ B/ C	Differenzierung/ Proliferation/ Überleben/ Degranulation von Mediatoren und Histamin/ Chemotaxis
<b>Keratinozyt</b>	NGF	trkA (p75 <sup>NTR</sup> )	Proliferation/ Differenzierung/ Immunflamatorische Reaktion
<b>Epithelzelle in der Lunge</b>	NGF/ BDNF	trkA/ C/ p75 <sup>NTR</sup>	Proliferation
<b>Eosinophile</b>	NGF/ NT-3	trkA/ B/ C/ p75 <sup>NTR</sup>	Differenzierung/ Überleben/ Proliferation/ Chemotaxis/ Cytolin- und Mediatorenproduktion
<b>Basophile</b>	Ø	trkA	Proliferation, Differenzierung, Leukotrien C4-Produktion/ Chemotaxis/ Histaminproduktion
<b>Neutrophile</b>	NGF/ BDNF/ NT-3	trkA/ B	Differenzierung/ Überleben/ Proliferation/ Chemotaxis/ Phagozytosebereitschaft
<b>MAC/ Monocyt</b>	NGF/ BDNF/ NT-3/ NT-4/5	trkB/ C/ p75 <sup>NTR</sup>	Differenzierung/ Proliferation/ Überleben/ Chemotaxis/ Phagozytosebereitschaft
<b>B-Zelle</b>	NGF/ BDNF/ NT-3	(trkA/ B/ C)	Proliferation/ Differenzierung/ AK- Synthese
<b>T-Zelle</b>	NGF/ BDNF/ NT-3/ NT-4/5	trkA/ trkB	Aktivierung/ Differenzierung/ Proliferation/ Überleben
<b>Stromazelle im KM</b>	NGF/ BDNF/ NT-4/5	trkB/ p75 <sup>NTR</sup>	Proliferation/ Stimulus auf sich entwickelnde Immunzellen

**Tabelle 1.2: Neurotrophine und deren Rezeptoren auf Immunzellen und Stromazellen/ resultierende Neurotrophinwirkung:**

Diese Tabelle zeigt, zugeordnet zu den einzelnen Zellen, die Expression der NT's und deren Rezeptoren auf. Bei der B-Zelle ist die trk- Rezeptor- Verteilung und der Nachweis in verschiedenen Puplicationen umstritten, daher wurden die trk- Rezeptoren in Klammern gesetzt. Haupteffekt der Neurotrophine, in erster Linie des NGF, ist die Proliferation, Differenzierung und die Anti- Apoptose.



### 1.2.5 Die Rolle der Neurotrophine im Pathomechanismus verschiedener Erkrankungen

Der Einfluß der Neurotrophine ist nicht nur bei physiologischen Abläufen des Nerven- und Immunsystems gegenwärtig. Auch im Rahmen neurologischer (-psychiatrischer) und immunologischer Erkrankungen lassen sich Neurotrophin-Wirkungen nachweisen. Insbesondere NGF ist nicht nur ein Wachstums- und Überlebensfaktor, sondern ein inflammatorischer Mediator, gerade im Hinblick auf allergische Erkrankungen.

In allergischen Erkrankungen spielen Neurotrophine eine Rolle in der Modulation der beteiligten Zellen. Im allergischen Asthma bronchiale werden Neurotrophine von Epithelzellen der Lunge (*Braun et al. 2001*) und den beteiligten Immunzellen produziert. Insbesondere NGF und BDNF werden in ihrer Konzentration erhöht. Die Folge ist eine Beeinflussung der sensorischen und motorischen Neurone (*Gonzales et al. 1997*) in der Lunge sowie der beteiligten Immunzellen (T-Zellen, B-Zellen, Monozyten und Mastzellen) (*James et al. 1999; Baun et al. 2001*). Diese exprimieren auch Neurotrophin-Rezeptoren  $\text{trkA}$  und  $\text{p75}^{\text{NTR}}$ ,  $\text{trkB}$  wird zusätzlich durch T-Zellen und Makrophagen exprimiert. Es folgt eine Stimulation von Neuropeptiden wie Substanz P, Neurokinin A und B aus sensorischen Neuronen (*de Vries et al. 2006*) und damit zu einer Verstärkung der neurogenen Entzündung. Das Ergebnis der Aktivierung der Neuronen zeigt sich in einer Zunahme der bronchialen Konstriktion, der Mukusproduktion (*Coleridge et al. 1994; Laloo et al. 1995; Karlsson et al. 1993*) sowie der Erhöhung der Kapillarpermeabilität und vaskulären Dilatation (*Barnes et al. 1996*). Die Erregbarkeit der Neurone im Sinne einer Hyperreagibilität erhöht. Des Weiteren proliferieren die beteiligten Immunzellen unter diesem Neurotrophin-Einfluß, ihre Zytokinproduktion sowie die IgE-Synthese wird erhöht. Mastzellen werden zu einer Degranulation stimuliert (*Mazurek et al. 1986; Pearce et al. 1986; Tam et al. 1997*). Insbesondere NGF führt zu einer Verstärkung der Aktivität der Immunzellen im Rahmen allergischer Erkrankungen.

Im Rahmen von Autoimmunerkrankungen wie der SLE (*Aalto et al. 2002*) und der cRA (*Falcini et al. 1996*) werden erhöhte NGF- Spiegel gemessen.

Bei der Erforschung der Mechanismen der Multiplen Sklerose, einer inflammatorischen neurodegenerativen Erkrankung, konnte ein protektiver Effekt von BDNF auf die Nervenzellen in den betroffenen Läsionen aufgezeigt werden (*Stadelmann et al. 2002; Kerschensteiner et al. 1999*). Dabei konnte eine Korrelation der BDNF- produzierenden Zellen und der Aktivität der Demyelinisierung ermittelt werden. Der trkB(gp145)- Rezeptor konnte auf den betroffenen Nervenzellen und von Astrozyten (*Wang et al. 1998*), jedoch nicht auf den agierenden Immunzellen in den betroffenen Läsionen nachgewiesen werden. BDNF wurde von den beteiligten Astrozyten gespeichert (*Rubio et al. 1997*) sowie produziert und den agierenden Immunzellen synthetisiert; dies zeigt zudem eine bivalente Funktion der Immunzellen auf. Zum einen produzieren sie die destruktiven (z.B. TNF- $\alpha$ ) im Rahmen dieser Erkrankung und zum anderen die neuroprotektive Faktoren, wie BDNF (*Moalem et al. 2000*). Zudem werden autokrine und parakrine Mechanismen im Bereich der Multiplen- Sklerose- Läsionen des Gehirns diskutiert (*Kokaia et al. 1993; Acheson et al. 1995; Marini et al. 1998*).

Untersuchungen an Patienten mit Psoriasis im Vergleich zu Patienten mit normaler Haut ergaben, dass der trkA- Rezeptor in Psoriasis- Läsionen oder nach UV- B- Irritationen der normalen Haut auf basalen Keratinozyten herunterreguliert wird (*Bull et al. 1998*). Zudem zeigten die Untersuchungen an den oben beschriebenen Patientenkollektiven eine Reduktion der p75<sup>NTR</sup>- Expression der dünnen Nervenfasern an der Haut im Bereich der Psoriasis- Plaques.

NGF reguliert in den sensorischen Nerven der Haut die Tachykinin- Synthese, z. Bsp. von Substanz- P und CGRP (*Lindsay et al. 1989; Watson et al. 1995; Gilchrist et al. 1991*). Durch intradermale Injektion von NGF konnte ein Anstieg der Konzentrationen der Tachykinine ähnlich eines inflammatorischen Stimulus nachgeahmt werden (*Otten et al. 1980; Leslie et al. 1995*). Die Induktion von Entzündung an der Haut führt zu einem Anstieg

der NGF- Konzentration in diesem Bereich (*Weskamp et al. 1987*). Dabei ist eine der Quellen für NGF die basalen Keratinozyten (*Marco et al. 1991; Pincelli et al. 1994; Raychaudhuri et al. 2004*). Bei einer erhöhten Konzentrationen von NGF, produziert von den basalen Keratinozyten auf inflammatorische Reize, kommt es zu einer Hypertrophie und eine Erhöhung der Tachykinine- Konzentration der Nerven in der Haut. Dieser Mechanismus der Steigerung der Inflammation durch Ausschüttung von Neuropeptiden wird als neurogene Entzündung bezeichnet (*Barnes et al. 2001*). Dies resultiert in einer Hyperalgesie (*Albers et al. 1994*). Zudem wird durch erhöhte NGF- Konzentrationen infolge inflammatorischer die trkA- Rezeptor- Expression herunterreguliert, um wohl die verstärkte Bindung an die trkA- Rezeptoren der Nervenzellen der Haut zu verstärken (*Bull et al. 1998*). Es folgt eine verstärkte neurogene Entzündung in diesem Bereich.

Im Rahmen der Untersuchungen von Neurotrophinen und Neurotrophin- Rezeptor- Expressionen im Bereich von Frakturen zeigte sich ein erhöhter Level an NGF und NT-3 nach 2 Tagen nach Fraktur und BDNF nach 8 Tagen (*Asaumi et al. 2000*). Dabei zeigt sich, dass alle Zellen im Frakturbereich NGF (*Grills et al. 1998*), Osteoblasten zusätzlich BDNF und NT-3 sowie hypertrophe Chondrozyten NT-3 synthetisieren. In weiteren Untersuchungen konnte belegt werden, daß die Zufuhr von NGF die Frakturheilung beschleunigt (*Grills et al. 1997; Schuijjer et al. 1995*). Insbesondere NT-3 führt zur Proliferation von Osteoblasten (*Nakanishi et al. 1994a*). Hinsichtlich der Rezeptoren konnte trkA auf allen Zellen im Frakturbereich sowie trkC auf Osteoblasten (*Nakanishi et al. 1994b*) und hypertrophe Chondrozyten detektiert werden. TrkB konnte nicht detektiert werden (*Asaumi et al. 2000*). Man mutmaßt auto- und parakrine Mechanismen der Neurotrophine im Zusammenhang mit der Frakturheilung.

Neurotrophine spielen eine zentrale Rolle zur Aufrechterhaltung und Entwicklung der neuronalen Funktionen. Im Rahmen neurologischer Erkrankungen sind auch Störungen der Neurotrophinproduktion und/ oder Neurotrophin- Rezeptor- Expression nachgewiesen worden.

So zeigt sich bei der Alzheimer Demenz, dass eine intracerebroventrikuläre Infusion mit NGF im Bereich der Läsionen die Degeneration der cholinergen Neuronen – einem wesentlichen pathogenetischen Merkmal der Alzheimer Demenz – die Degeneration verhindern konnte (*Hefti et al. 1986; Gage et al. 1987*), insbesondere der cholinergen Degeneration des basalen Vorderhirns (*Koliatsos et al. 1990; Tuszynski et al. 1990/ 1991*). Zudem zeigte die Behandlung mit NGF im Modell eine Förderung von Abbauwegen, die nicht in Amyloidplaques endeten (*Rossner et al. 1998*). Man stellte schon sehr früh die Hypothese eines NGF- Mangels als ein Faktor zur Pathogenese des Morbus Alzheimer auf (*Hefti et al. 1983*).

Jedoch wurden in weiteren verschiedenen Studien normale bis erhöhte NGF-Konzentrationen im Alzheimer- Gehirn gefunden (*Kordower et al. 1989; Hefti et al. 1991; Crutcher et al. 1993; Scott et al. 1995*). Wahrscheinlich stellt dies einen Kompensationsmechanismus bei gleichzeitig reduzierter trkA-Rezeptor- Expression auf den cholinergen Neuronen der betroffenen Gehirnregionen dar (*Strada et al. 1992; Mufson et al. 1996; Salehi et al. 1996/ 2004; Boissiere et al. 1997*). Dies würde den Mechanismus einer gestörten NGF- Aufnahme (*Hock et al. 2000*) in den betroffenen Bereichen erklären, der wiederum einen NGF- Mangel bedingt.

In neurologischen Tumoren wie Astrozytome und Glioblastome ließ sich eine trkA- Rezeptor- Expression nachweisen (*Connor et al. 1996/ 1998; Aguado et al. 1998*) sowie auch trkB- und trkC- Rezeptoren (*Wang et al. 1998*), zudem konnte eine NGF- Synthese nachgewiesen werden (*Emmett et al. 1997*).

Im Rahmen inflammatorischer Signale und Entzündungskaskaden im Gehirn konnte eine NGF- Synthese in der Mikroglia nachgewiesen werden (*Heese et al. 1998; Kossmann et al. 1996*).

### 1.3 Zielsetzung der Arbeit

Neurotrophine und deren resultierenden Rezeptoren sind nicht nur auf die Zellen des Nervensystems beschränkt. Sie lassen sich insbesondere auf den verschiedenen Zellen des Immunsystems nachweisen.

Untersuchungen der B-Zellen zeigen jedoch widersprüchliche Ergebnisse hinsichtlich der Expression der Neurotrophin- Rezeptoren und der Neurotrophinsynthese. Einige Autoren zeigten auf, dass alle trk- Rezeptoren durch B-Zellen exprimiert werden (*D'Onofrio et al. 2000; Schenone et al. 1996*). Andere Autoren zeigen lediglich eine Expression von trkA und p75<sup>NTR</sup> auf (*Torcia et al. 1996; Brodie et al. 1996*).

Diese Arbeit befasst sich mit der Beantwortung folgender Fragen:

- ◆ Charakterisierung des Zellmilieus im KM und der Milz.
- ◆ Exprimieren B-Zellen alle Neurotrophin- Rezeptoren?
- ◆ Welche Neurotrophine lassen sich in den B-Zellen nachweisen?
- ◆ Wenn B-Zellen die Neurotrophin- Rezeptoren und die entsprechenden Neurotrophine produzieren, gibt es einen Unterschied im mRNA-Gehalt für Neurotrophin- Rezeptoren und Neurotrophine zwischen B-Zellen des KM's und B-Zellen aus der Milz?

## 2. Material und Geräte

### 2.1 Tiere

Für die Studie wurden 17 Tage alte männliche und weibliche C57BL/6 Mäuse (Harlan Winkelmann GmbH, Borcheln, 33178 Germany) verwendet. Der Großteil der Versuchstiere stammte aus der eigenen Zucht (*siehe Kap. 3.1.2*).

### 2.2 Geräte und Hilfsmittel

**Tabelle 2.1:** Geräte und Hilfsmittel für Zellgewinnung, Zellseparation und Zellzählung

Produkt	Katalognummer	Hersteller
Sterile Zellkulturarbeitsplatte	51013545	Heraeus, Kendro Laboratories
Laborwaage ARS 220-4	ARS 220-4	Kern & Sohn GmbH; Dtschl.
Low Binding Spitzen, 1- 200µl	8151.1	Roth
Low Binding Spitzen, 100- 1000µl	8164.1	Roth
Micro Tube, 2ml	72.609	Sarstedt
Nunc- Sieb (Nylon), 100µm	352360	Becton Dickinson Labware
Schraubverschlüsse für Micro Tube, 2ml	65.716	Sarstedt
Zentrifuge Rotring 48RS	3024214-0	Hettich
Filterkarton	3425	HERAEUS
Objektträger 76 x 26 mm	021102	Menzel- Gläser
Zytozentrifuge- Container	3416	HERAEUS
Deckgläschen, 10 Stück für Hämacytometer 20 x 26 mm	(-/-)	Günther Wilke, Hamburg
Klinwipes Präzisionstücher	7106	Kimberly- Clark
Mikroskop Olympus BH-2	215283	Olympus

Neubauer Zählkammer 1 Stück	6311130	Superior, Marienfeld, Germany
Tektronix Phaser 740L	Z740V (Modell no.)	Tektronix, Inc. Oregon, USA
Zellzähler, manuell Leukotron 10	EB505	Ferrari elektronik, GmbH
Pipette Reference, fix (gelb) 10µl – 100µl	4900 000.109 - 133	Eppendorf, Germany
Pipette Reference, fix (blau) 200µl – 1000µl	4900 000.508 - 524	Eppendorf, Germany
Pipettenkarussell für 6 Pipetten	3115 000.003	Eppendorf, Germany
Falcon Röhrchen 15ml	No 50 REF 62.554.002	Falcon, Germany
Transferpipette	LOT No 9-H-86	Roth

**Tabelle 2.2:** Geräte und Hilfsmittel für die Magnetisch aktivierte Zell Separation (MACS)

Produkt	Katalognummer	Hersteller
AS <sup>+</sup> Separation Column	130-042-901	Miltenyi Biotec
Magnetic Cell Sorter Vario MACS Plexiglas- Ständer	1363	Miltenyi Biotec
MS <sup>+</sup> Separation Columns plus collection tubes (formerly RS <sup>+</sup> Separation Columns)	130-041-301 (old Order No. 413-01)	Miltenyi Biotec
Pre- Separation Filters 30µm	414-07	Miltenyi Biotec
Standzylinder, 500ml		Brand, Germany
Pipette Reference, fix (gelb) 10µl – 100µl	4900 000.109 - 133	Eppendorf, Germany
Pipette Reference, fix (blau) 200µl – 1000µl	4900 000.508 - 524	Eppendorf, Germany
Pipettenkarussell für 6 Pipetten	3115 000.003	Eppendorf, Germany
Low Binding Spitzen, 1- 200µl	8151.1	Roth
Low Binding Spitzen, 100- 1000µl	8164.1	Roth

**Tabelle 2.3:** Geräte und Hilfsmittel für die Fluoreszenz aktivierte Zell Separation (FACS)

Produkt	Katalognummer	Hersteller
Deckgläschen, 10 Stück für Hämacytometer 20 x 26 mm	(-/-)	Günther Wilke, Hamburg

FACScan- Gerät; Dezember 1987	95-10107-00	Becton Dickinson
Klinwipes Präzisionstücher	7106	Kimberly- Clark
MAC OS Computer Apple Computer	MAC OS 8.6	Apple Computer, Inc.1983-1999, USA
Mikroskop Olympus BH-2	215283	Olympus
Neubauer Zählkammer 1 Stück	6311130	Superior, Marienfeld, Germany
Nunc- Sieb (Nylon), 100µm	352360	Becton Dickinson Labware
Tektronix Phaser 740L Printer	Z740V (Modell no.)	Tektronix, Inc. Wilsonville, Oregon
Zellzähler, manuell Leukotron 10	EB505	Ferrari elektronik, GmbH
Cell Quest™ Software Reference Manual Sept. 1997	11-10865-01 Rev B	Becton Dickinson
Low Binding Spitzen, 1- 200µl	8151.1	Roth
Low Binding Spitzen, 100- 1000µl	8164.1	Roth
Pipette Reference, fix (gelb) 10µl – 100µl	4900 000.109 - 133	Eppendorf, Germany
Pipette Reference, fix (blau) 200µl – 1000µl	4900 000.508 - 524	Eppendorf, Germany
Pipettenkarussell für 6 Pipetten	3115 000.003	Eppendorf, Germany

**Tabelle 2.4:** Geräte und Hilfsmittel für die qualitative Polymerase Ketten Reaktion (PCR), cDNA- Synthese, RNA- Gewinnung, Agarosegelelektrophorese

Produkt	Katalognummer	Hersteller
Collection Tubes (2ml), 1000 Stück	19201	Qiagen
Elektrophoresegerät	(-/-)	Pharmacia Biotech, Freiburg
Gene Quant II RNA/ DNA Calculator	80-2105-98 (Modell No.) 61324 (Serial No.)	Pharmacia Biotech, Freiburg
Präzisionsküvette aus Quarzglas Suprasil®	105.202.008-QS	Hellma
QIA shredder column (50)	79654	Qiagen
QIA shredder column (250)	79656	Qiagen
RNeasy Mini Kits (250) for animal cells or tissues, yeast and bacteria (RNAse free Reagents and Buffers)	74106	Qiagen



Waage 0,05 – 111g	36050025	Sartorius GmbH, Göttingen
Zentrifuge Mikro 22R	0000379-02-00	Hettich
Pipette Reference, fix (gelb) 10µl – 100µl	4900 000.109 - 133	Eppendorf, Germany
Pipette Reference, fix (blau) 200µl – 1000µl	4900 000.508 - 524	Eppendorf, Germany
Pipettenkarussell für 6 Pipetten	3115 000.003	Eppendorf, Germany
GEloader Tips 0,5 – 20µl	0030 001.222	Eppendorf, Germany
Safe – Lock Reaktionsgefäß 0,5- 2,0ml	0030 121.023 - 094	Eppendorf, Germany
Biopur® Safe – Lock Reaktionsgefäß 0,5- 2,0ml	0030 121.570 - 597	Eppendorf, Germany
Pipettenspitze Biopur® 20µl – 1000µl	0030 065.506 - 590	Eppendorf, Germany
RoboCycler® Gradient 96Temperature Cycler with Hot Top Assembly and Accessories	400886 (230 V)	Stratagene, La Jolla, United States
Thermocycler Trioblock	(-/-)	Biometra, Göttingen

**Tabelle 2.5:** Hilfsmittel und Geräte für die quantitative Polymerase Ketten Reaktion (PCR)

Produkt	Katalognummer	Hersteller
QuantiTect™ SYBR® Green PCR	204143	Qiagen GmbH, 40724 Hilden, Germany
LightCycler FastStart DNA Master SYBR Green I	3 003 230 2 239 264	Roche Diagnostics GmbH, 68305 Mannheim, Germany
LightCycler Instrument Version 3,5	2011 468	Roche Diagnostics GmbH, 68305 Mannheim, Germany
LightCycler Sample Carousel	1 909 282	Roche Diagnostics GmbH, 68305 Mannheim, Germany
LightCycler Capillaries	1 909 339	Roche Diagnostics GmbH, 68305 Mannheim, Germany
LightCycler Centrifuge Adapter	1 909 312	Roche Diagnostics GmbH, 68305 Mannheim, Germany
LightCycler Software Package	1 909 304	Roche Diagnostics GmbH, 68305 Mannheim, Germany

Windows 2000 Betriebssystem	Win 2000 + SP 4	Windows Corporation, Germany/ USA
Hewlett Packard Inkjet Colour Printer	HP Deskjet 5652	Hewlett Packard Development Company
Pipette Reference, fix (gelb) 10µl – 100µl	4900 000.109 - 133	Eppendorf, Germany
Pipette Reference, fix (blau) 200µl – 1000µl	4900 000.508 - 524	Eppendorf, Germany
Pipettenkarussell für 6 Pipetten	3115 000.003	Eppendorf, Germany
GEloader Tips 0,5 – 20µl	0030 001.222	Eppendorf, Germany
Safe – Lock Reaktionsgefäß 0,5-2,0ml	0030 121.023 - 094	Eppendorf, Germany
Biopur® Safe – Lock Reaktionsgefäß 0,5-2,0ml	0030 121.570 - 597	Eppendorf, Germany
Pipettenspitze Biopur® 20µl – 1000µl	0030 065.506 - 590	Eppendorf, Germany

## 2.3 Lösungen und Reagenzien

**Tabelle 2.6:** Lösungen und Reagenzien für Zellgewinnung, Zellseparation und Zellzählung

Produkt	Katalognummer	Hersteller
BSA (Bovines Serum Albumin, Fraktion V), 100g	A7888	SIGMA
Fetales Kälberserum (FKS)	S0115	Seromed von Biochrom AG, Germany
Lympholyte®, 500ml	CL 5035	Cedarlane, Canada
Maus- Serum 1%ig; (mouse serum)	X0910	DAKO
PBS (phosphate buffered saline), pH7,3; Mg <sup>2+</sup> -/ Ca <sup>2+</sup> - frei; steril 100ml	D-8662	PAA Laboratories GmbH, Austria
RPMI 1640	E15-039	PAA Laboratories, Austria

**Tabelle 2.7:** Lösungen und Reagenzien für die Magnetisch aktivierte Zellseparation (MACS)

Produkt	Katalognummer	Hersteller
BSA (Fraction V), 100g	A7888	SIGMA

CD45R (B220) MicroBeads, 2ml Rat Anti-Mouse, monoclonal Clone: RA3-6B2	495-01	Miltenyi Biotec
EDTA Dinatriumsalz Dihydrat (Titrierkomplex III)	8043,2	Carl Roth GmbH&Co 76185 Karlsruhe
Lympholyte, 500ml	CL5035	Cedarlane, Canada
Mausserum, 1%ig (Mouse serum)	X0910	DAKO
PBS (phosphate buffered saline), pH 7,3; Mg <sup>2+</sup> -/ Ca <sup>2+</sup> - frei, steril	H15-002	PAA Laboratories GmbH, Austria

**Tabelle 2.8:** Lösungen und Reagenzien für die Fluoreszenz aktivierte Zell Abtastung (FACS)

Produkt	Katalognummer	Hersteller
CD135 (Flk-2), 0,1mg Rat Anti-Mouse, monoclonal R-PE- conjugated	553842	Pharmingen, Becton Dickinson
CD19, 0,1mg Rat Anti-Mouse, monoclonal FITC- conjugated	557398	Pharmingen, Becton Dickinson
CD19, 0,1mg Rat Anti-Mouse, monoclonal R-PE- conjugated	09655A	Pharmingen, Becton Dickinson
CD19, 0,5mg Rat Anti-Mouse, monoclonal FITC- conjugated	553785	Pharmingen, Becton Dickinson
CD34, 0,5mg Rat Anti-Mouse, monoclonal FITC- conjugated	01904D	Pharmingen, Becton Dickinson
CD45 (Ly-5), 0,1mg Rat Anti-Mouse, monoclonal FITC- conjugated	553080	Pharmingen, Becton Dickinson
CD45 (Ly-5), 0,1mg Rat Anti-Mouse, monoclonal R-PE- conjugated	553081	Pharmingen, Becton Dickinson
CD45R (B220), 0,1mg Rat Anti-Mouse, monoclonal FITC- conjugated	01124A	Pharmingen, Becton Dickinson

CD45R (B220), 0,5mg Rat Anti-Mouse, monoclonal FITC- conjugated	01124D	Pharmingen, Becton Dickinson
CD45R (B220), 0,1mg Rat Anti-Mouse, monoclonal Cy- conjugated	01128A	Pharmingen, Becton Dickinson
Cell Wash <sup>®</sup>	349524	Becton Dickinson
FACSClean <sup>®</sup>	340345	Becton Dickinson
FACSFlow <sup>®</sup>	342003	Becton Dickinson
FACSafe <sup>®</sup>	340345	Becton Dickinson
FACSRinse <sup>®</sup>	340346	Becton Dickinson
IgG <sub>2a</sub> , 0,1mg Rat, monoclonal immunoglobulin isotype standard FITC- conjugated	11024C	Pharmingen, Becton Dickinson
IgG <sub>2a</sub> , 0,1mg Rat, monoclonal immunoglobulin isotype standard R-PE- conjugated	553930	Pharmingen, Becton Dickinson
IgG <sub>2a</sub> , 0,1mg Rat, monoclonal immunoglobulin isotype standard Cy- conjugated	11028A	Pharmingen, Becton Dickinson
IgG <sub>2b</sub> , 0,25mg Rat, monoclonal immunoglobulin isotype standard FITC- conjugated	553988	Pharmingen, Becton Dickinson
IgG <sub>2b</sub> , 0,25mg Rat, monoclonal immunoglobulin isotype standard Cy- conjugated	553990	Pharmingen, Becton Dickinson
IgG <sub>1</sub> , 0,1mg RAT, monoclonal immunoglobulin isotype standard R-PE- conjugated	11015A	Pharmingen, Becton Dickinson
Ly-6G (Gr-1)/ Ly-6C, 0,1mg Rat Anti-Mouse, monoclonal FITC- conjugated	553126	Pharmingen, Becton Dickinson

Ly-6G (Gr-1)/ Ly-6C, 0,5mg Rat Anti-Mouse, monoclonal FITC- conjugated	553127	Pharmingen, Becton Dickinson
MAC3, 0,1mg Rat Anti-Mouse, monoclonal FITC- conjugated	01784D	Pharmingen, Becton Dickinson
Mausserum, 1%ig (mouse serum)	X0910	DAKO
PAN-NK, 0,5mg Rat Anti-Mouse, monoclonal FITC- conjugated	553857	Pharmingen, Becton Dickinson
PBS (phosphate buffered saline), pH 7,3 ; Mg <sup>2+</sup> -/ Ca <sup>2+</sup> - frei, steril	H15-002	PAA Laboratories GmbH, Austria
TER-119/ Ly-76, 0,2mg Rat Anti-Mouse, monoclonal R-PE- conjugated	553673	Pharmingen, Becton Dickinson

**Tabelle 2.9:** Lösungen und Reagenzien für die qualitative Polymerase Ketten Reaktion (PCR), cDNA- Synthese, RNA- Gewinnung, Agarosegelelektrophorese

Produkt	Katalognummer	Hersteller
Agarose für DNA/ RNA	1 365 376	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim
Puffer RLT, 220ml RNeasy Lysis Buffer	79216	Qiagen
DEPC- treated water 4 x 1,25ml	10813-012	Life Technologies Cibco BRL <sup>®</sup>
DNA Ladder (100bp)	15628-019	Life Technologies Cibco BRL <sup>®</sup>
DNA Ladder (25bp)	10597-011	Life Technologies Cibco BRL <sup>®</sup>
DNase I (RNase- free)	1010395	Qiagen
DNA Typing Grade <sup>®</sup> Agarose	14610-018	Life Technologies Cibco BRL <sup>®</sup>
dNTP Mix, 200µl	0032 003.001	Eppendorf
Ethidiumbromid 10 mg/ ml		Sigma, Deisenhofen
Gel Loading Solution	G2526	Sigma, Deisenhofen
0,1 M DTT	10183 - 013	Life Technologies Cibco BRL <sup>®</sup>

PD(N) Random Hexamer 5'Phosphat, Sodium Salt 50Units in 1ml DEPC-treated water gelöst, 1:6 verdünnt	27-2166-01	Fa. Amersham Pharmacia Biotech
Recombinante Ribonuklease Inhibitor RNase OUT™	10777-019	Life Technologies Cibco BRL®
RNase- free DNase Set (50)	79254	Qiagen
Superscript™ RNase H <sup>minus</sup> Rev. T.	18064-014	Life Technologies Cibco BRL®
Taq Buffer (10 x) 15nM MgCl <sub>2</sub>	0032 002.307	Eppendorf
Taq DNA Polymerase	0032 002.307	Eppendorf
Taq DNA Polymerase, recombinant	10342-020	Life Technologies Cibco BRL®
Taq DNA Polymerase Kit (250 Units) (Taq-DNA-Polymerase, QIAGEN-PCR-Buffer, MgCl <sub>2</sub> 25mM)	201203	Qiagen
TBE Puffer, 1000ml (1:100 verdünnt)	15581-044	Life Technologies Cibco BRL® ultra pure

**Tabelle 2.10:** Primer- Design für die qualitative Polymerase Ketten Reaktion (PCR)

Primer	Forward / Reverse	Sequenz (5'-3')	Hersteller
Beta-Aktin	FW	CCA ACC GTG AAA AGA TGA CC	Metabion GmbH 82152 Germany
	RV	TTT GAT GTC ACG CAC GAT TT	Metabion GmbH
GABDH	FW	ACC CAG AAG ACT GTG GAT GG	Metabion GmbH
	RV	GGA GAC AAC CTG GTC CTC AG	Metabion GmbH
trkA	FW	CGT AGT CCC AGC CAG TGT GC	Metabion GmbH
	RV	TCA GGG TTG AAC TCA AAA GG	Metabion GmbH
trkB (gp95)	FW	TGC ACA CTA AAA GTC TAA TCC ACA	Metabion GmbH
	RV	TGG ACT TTG AAA GCA ATC GTT	Metabion GmbH
trkB (gp145)	FW	AAA TCG CAG CAG GTA TGG TC	Metabion GmbH
	RV	GTT CTG AAG GAG GGT GTG GA	Metabion GmbH

trkC	FW	ACC TGA CTG TCC GAG AAG GA	Metabion GmbH
	RV	CCT CCC CCT CCT GGT AGT AG	Metabion GmbH
p75	FW	CCA GAG CGA GAC CTC ATA GC	Metabion GmbH
	RV	GCA GTC TGT GTG TGG GTC TG	Metabion GmbH
NGF	FW	GTG TCA GTG TGT GGG TTG GA	Metabion GmbH
	RV	GCC TTG ACG AAG GTG TGA GT	Metabion GmbH
BDNF	FW	AGG ACG CGG ACT TGT ACA CT	Metabion GmbH
	RV	TCA GTT GGC CTT TGG ATA CC	Metabion GmbH
NT3	FW	CTG AGT GAC AGC ACC CCT TT	Metabion GmbH
	RV	CAG CAC TGT GAC CTG GTG TC	Metabion GmbH

**Tabelle 2.11:** Lösungen und Reagenzien für die quantitative Polymerase Ketten Reaktion (PCR)

Produkt	Katalognummer	Hersteller
QuantiTec SYBR Green PCR Kit (HotStarTaq <sup>™</sup> , SYBR Green PCR Buffer, dNTP-mix, SYBR Green I, ROX, MgCl <sub>2</sub> 5mM)	204143	Qiagen GmbH, 40724 Hilden, Germany
Puffer RLT, 220ml RNeasy Lysis Buffer	79216	Qiagen
DEPC- treated water 4 x 1,25ml	10813-012	Life Technologies Cibco BRL <sup>®</sup>
Recombinante Ribonuklease Inhibitor RNase OUT <sup>™</sup>	10777-019	Life Technologies Cibco BRL <sup>®</sup>
RNAse- free DNase Set (50)	79254	Qiagen
Superscript <sup>™</sup> RNase H <sup>minus</sup> Rev. T.	18064-014	Life Technologies Cibco BRL <sup>®</sup>
PD(N) Random Hexamer 5'Phosphat, Sodium Salt 50Units in 1ml DEPC-treated water, 1:6	27-2166-01	Fa. Amersham Pharmacia Biotech
dTNP Mix, 200µl	0032 003.001	Eppendorf
0,1 M DTT	10183 - 013	Life Technologies Cibco BRL <sup>®</sup>

**Tabelle 2.12:** Primer – Design für die quantitative Polymerase Ketten Reaktion (PCR)

<u>Primer</u>	Forward / Reverse	Sequenz (5'-3')	Hersteller
Beta-Aktin	FW	GGC TCC TAG CAC CAT GAA GA	Metabion GmbH
	RV	ACT CCT GCT TGC TGA TCC AC	Metabion GmbH
GAPDH	FW	ACC CAG AAG ACT GTG GAT GG	Metabion GmbH
	RV	TTC AGC TCT GGG ATG ACC TT	Metabion GmbH
trkA	FW	TGA TGT CTA CGC CAT CAT GC	Metabion GmbH
	RV	TAG CCC AGA ACG TCC AGG TA	Metabion GmbH
trkB (gp95)	FW	AAG ATC CCA CTG GAT GGG TA	Metabion GmbH
	RV	AAG CAG CAC TTC CTG GGA TA	Metabion GmbH
trkB (gp145)	FW	AAG GCA TCT CCC GTC TAC CT	Metabion GmbH
	RV	GCA GTC AAG AGG TTC GTC GT	Metabion GmbH
trkC	FW	GAA GGA GAC AAT GCC GTG AT	Metabion GmbH
	RV	TGG CAT GTA CAT TGG TCC AG	Metabion GmbH
p75	FW	GAG AGA GAG TGT GGT CAG AA	Metabion GmbH
	RV	AAC CGA GCA TCT CTG TGT AG	Metabion GmbH
NGF	FW	CCC TTT CAA CAG GAC TCA CC	Metabion GmbH
	RV	TTG ATG TCT GTG GCT GTG GT	Metabion GmbH
BDNF	FW	AGC TGA GCG TGT GTG ACA GT	Metabion GmbH
	RV	TCA GTT GGC CTT TGG ATA CC	Metabion GmbH
NT-3	FW	CGG TGG TAG CCA ATA GAA CC	Metabion GmbH
	RV	TGT CAA TGG CTG AGG ACT TG	Metabion GmbH



### 3. Methoden

#### 3.1 Arbeiten mit Tieren

##### 3.1.1 Haltung und Pflege

Für die Studie wurden 17 Tage alte männliche und weibliche C57BL/6 Mäuse (Harlan Winkelmann GmbH, Borcheln, 33178 Germany) verwendet. Die Mäuse wurden in Gruppen zu je 6 Tieren mit einer Amme ausschließlich unter pathogen freien Bedingungen in einzeln ventilierten Käfigen gehalten. Die Versuchstiere erhielten eine OVA-freie Nahrung und aqua ad libitum, um eine Kontamination seitens der Nahrung mit anschließender Reaktion des Immunsystems bzw. eine Sensibilisierung auszuschließen.

Das geeignete Eintrittsalter der Versuchstiere von 17 Tagen richtete sich nach einem dieser Studie parallel durchgeführtem Projekt mit BDNF- Knock-out Mäusen, deren maximale Überlebenszeit post partum 16 – 17 Tage betrug. Hierfür fanden die Ergebnisse dieser Arbeit als Kontrollgruppe, im Sinne einer Wildtyp- Vergleichsgruppe, Verwendung.

##### 3.1.2 Eigene Zucht

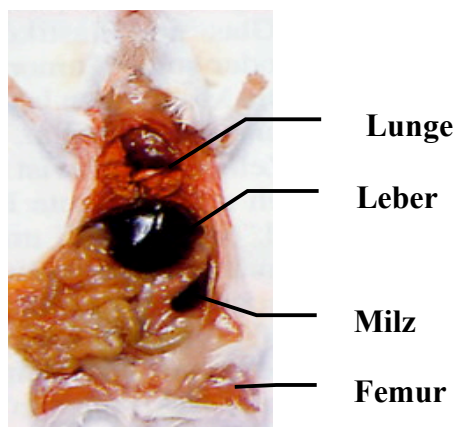
Um eine ausreichende Anzahl an geeigneten Versuchstieren zu garantieren, wurde die Mehrzahl der Mäuse aus einer eigenen Zucht gewonnen. Diese erfolgte mit adulten C57BL/6 Mäusen ab einem Alter von mindestens 8 Wochen. Hierfür wurde jeweils ein in Frage kommendes Männchen und Weibchen in einem Käfig, welcher denselben pathogen- freien Bedingungen unterlag wie die normale Haltung der Tiere, verpaart. Durch die Inspektion des äußeren Genitales der weiblichen Maus wurde eine eventuell erfolgreiche Befruchtung kontrolliert. Die Bildung eines zähen Schleimpfropfes am Genital des Weibchens galt hierfür als relatives sicheres Zeichen einer beginnenden Schwangerschaft, worauf die Tiere voneinander getrennt wurden. Die Dauer der Gravidität betrug ca. 18 – 20 Tage. Nach erfolgter Geburt verblieben die Jungtiere noch 2 Wochen beim Muttertier und

wurden anschließend nach dem Geschlecht sortiert in Gruppen zu je 6 Tieren in andere Käfige umgesetzt. Mit dem Erreichen des 17. Lebensstages wurde aus diesen Gruppen die benötigte Anzahl an Versuchstieren entnommen.

Die Durchführung der Zucht und die weitere Behandlung der Versuchstiere erfolgte nach den gültigen gesetzlichen Vorgaben gemäß Artikel 59b – 61a TSchV vom 27.05.1981 und §15 und §9 TschG vom 09.03.1978.

### 3.1.3 Präparation der Tiere

Die Versuchstiere wurden am Tag der Analyse durch zervikale Dislokation getötet. Der ausgefallene Kornealreflex diente hierbei zur Feststellung des Todes. Die Maus wurde zur Präparation auf den Rücken gelegt und an den Extremitäten und am Kopf mittels Kanülen am Präpariertisch fixiert. Nach Desinfektion der Haut mit 70%igen Alkohol erfolgte die Eröffnung der Peritonealhöhle mit einer Schere (*Abb. 3.1*). Unter vorsichtiger stumpfer Präparation wurde die Milz exstipiert und in einer Petrischale mit 5ml PBS auf Eis aufbewahrt.



**Abbildung 3.1: Präparationssitus.** Darstellung des Situs des Versuchstieres nach Eröffnung der Peritoneal- und Thoraxhöhle. Deutlich zu erkennen ist die durch Einblutung schwarz hervortretende Leber, Milz und Lunge (*Roit I. et al. 1995*).

Mittels Pinzette und Schere wurde die Muskulatur am Becken vorsichtig frei präpariert. Dadurch trat das Hüftgelenk hervor. Mit Hilfe eines Skalpells wurde das Hüftgelenk vom umgebenden Bindegewebe gelöst und anschließend der Hüftkopf aus der Gelenkpfanne heraus gehobelt. Unter stumpfer Präparation mit dem Skalpell erfolgte die Lösung der restlichen Muskulatur und des übrigen Bandapparates vom Femur. Durch eine Schere

wurde der Femur im Kniegelenk exartikuliert. Der so frei gelegte Knochen wurde dann am Collum femoris vom Gelenkkopf und direkt über den Kondylen vom restlichen Kniegelenk mittels eines Skalpells abgesetzt. Die eröffnete Markhöhle des Schaftes wurde darauf mit einer Kanüle mit 5 ml eiskühlem PBS gespült und das gewonnene Knochenmark in einer Petrischale auf Eis aufgefangen und sofort weiterverarbeitet.

#### 3.1.4 Isolierung von mononukleären Zellen aus Knochenmark und Milz

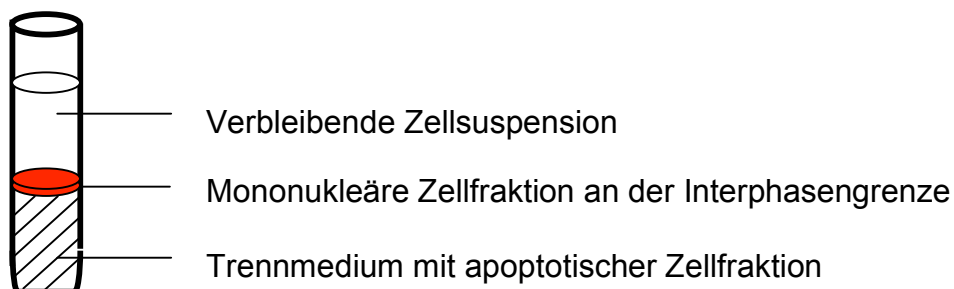
Grundvoraussetzung dieser Prozedur ist das unbedingte Arbeiten unter sterilen Bedingungen unter einer Zellkulturarbeitsplatte mit separaten Luftfiltersystem und autoklaviertem Instrumentarium.

In einer Petrischale wurden 2 – 3 ml RPMI 1640 gegeben und das Nylonsieb darauf platziert. Die zuvor präparierte Milz wurde auf das Nylonsieb gelegt und mittels einer feinen Präparierschere zerschnitten. Diese Milzgewebestücke wurden sodann mit dem gummierten Stempel einer 1 ml Insulinspritze durch das Sieb gedrückt bis nur noch weißes bzw. farbloses Bindegewebe verblieb. Das Sieb wurde mit RPMI 1640 gespült und aus der Petrischale entfernt. Es wurde nun ein 10 µl Aliquot für die Bestimmung der relativen Gesamtzellzahl mittels Neubauer Zählkammer (*siehe Kap. 3.2*) entnommen. Mit einer Transferpipette wurde die so entstandene Zellsuspension (ca. 4 ml) 10 mal resuspendiert und in ein mit 3 ml und auf ein mit RT temperiertes Lympholyte<sup>®</sup> vorgefülltes Falcon Röhrchen pipettiert (*Biozol Diagnostica Lympholyte<sup>®</sup>-M Protocol 2000*). Bei diesem Transfervorgang in das Trennmedium war darauf zu achten, dass sich die beiden Medien nicht vermischten. Die Zellsuspension mußte dem Trennmedium aufliegen und eine zweite Phase über dem Lympholyte<sup>®</sup> bilden. Das so präparierte Falcon – Röhrchen wurde bei 1300 g (2700 rpm mit Anlaufgeschwindigkeit Stufe 3) 20 min bei RT zentrifugiert. Die Bremse der Zentrifuge mußte ausgeschaltet sein, da ein schnelles und abruptes Abbremsen am Ende der Zentrifugation die entstandenen Zellschichten in den unterschiedlichen Dichtefraktionen der Lympholyte<sup>®</sup> zerstört.

Die an der Interphasengrenze der beiden Medien entstandenen Zellringe (*Abb. 3.2*), bestehend aus Lymphozyten und Monozyten, wurden vorsichtig

mit einer Pipette abgenommen und in einem neuen Falcon – Röhrchen mit 5 ml RPMI 1640 überführt und auf einem Rüttelmischer in Suspension gebracht. Anschließend erfolgte ein 3maliges Waschen mit RPMI 1640 unter Zentrifugation (800g für 10 min mit Bremse und Anlaufgeschwindigkeit 9). Das entstandene Zellpellet wurde in 5 ml RPMI 1640 aufgenommen, auf einem Rüttelmischer in Suspension gebracht und bei 4°C gekühlt.

Die Isolierung der mononukleären Zellfraktion aus dem Knochenmark folgte demselben Prinzip und Methodik wie der der Milz. Hierbei war nur zu beachten, dass die bei der Präparation des Femurs entstandene Zellsuspension vor dem Aufbringen auf das Nylonsieb gründlich auf dem Rüttelmischer in Suspension gebracht werden mußte, um die noch bestehenden Zellverbände des Knochenmarks zu lösen. Bindegewebe und feine Knochensplitter wurden durch die sich anschließende Verarbeitung mit dem Nylonsieb entfernt. Die Gewinnung der mononukleären Fraktion aus dem KM erfolgt mittels der Dichtegradientenzentrifugation mit Lympholyte®.



**Abbildung 3.2: Zellfraktionen nach Dichtegradientenzentrifugation**

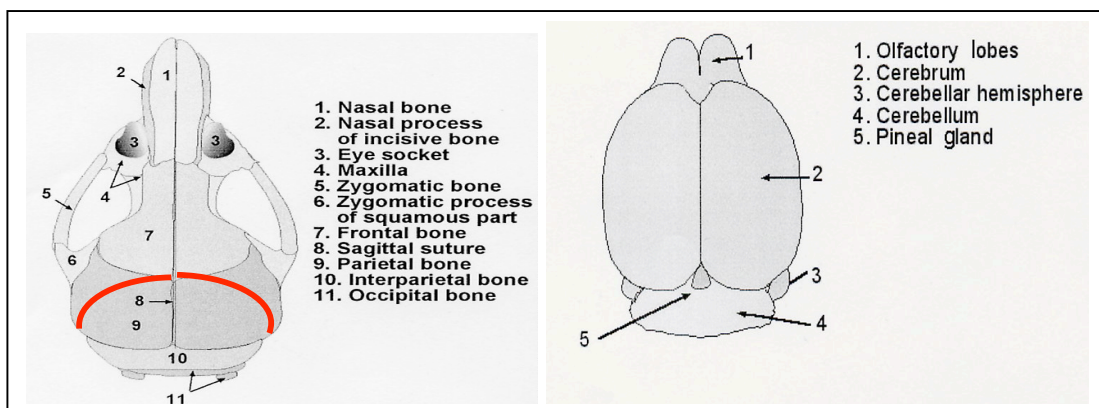
Aufgrund ihrer Dichte lagern sich Lymphozyten und Monozyten an der Interphasengrenze zwischen Trennmedium und Zellsuspension an. Vorteil dieser Methode ist weiterhin die Trennung vitaler von apoptotischen Zellen bzw. Zellfragmenten.

### 3.1.5 Präparation von Gehirn

Als Standard der molekularbiologischen Untersuchung der NTs und NT-Rezeptoren wurden Zellen des ZNS der Maus verwendet. Das vorher durch cervicalen Dislokation getötete Versuchstier wurde in Bauchlage mittels feinen Kanülen auf dem Präpariertisch fixiert. Die Desinfektion des Kopfes und der oberen Rückenpartie erfolgte mit 70%igen Alkohol. Mit einem feinen Skalpell wurde ein nuchaler horizontaler Hautschnitt in Höhe der oberen Halswirbel vollzogen. Unter vorsichtiger stumpfer Präparation wurde der gesamte Schädel skalpiert. Die darunter hervorkommende Membran, die den gesamten Schädel der Maus umgibt, wurde unter schabenden Bewegungen

mit dem Skalpell entfernt. Die Halsmuskulatur wurde mit einer feinen Präparierschere abgetrennt, so dass das Os occipitale und die oberen Halswirbel freilagen. Der Kopf wurde dann zwischen Foramen magnum des Os occipitale und 1. Halswirbel abgesetzt. Vom Foramen magnum ausgehend wurde mit einer feinen Präparierschere unter kleinen Schnitten die Schädelhöhle eröffnet, dabei erfolgte die Schnittführung beidseits bogenförmig über das Os parietale bis zur Sutura sagittalis (Abb. 3.3), die zuvor mittels eines Skalpells gespalten wurde. Die durch die Schnitte entstandenen Fragmente der Kalotte wurden mit einer Pinzette entfernt, so dass ein Großteil des Cerebrums und das Cerebellum (Abb. 3.3) frei lagen. Diese wurden mit einer Kanüle aus dem Schädel heraus präpariert und in eine Petrischale mit 3 ml eisgekühlten PBS gelegt.

Die weitere Präparation erfolgte unter sterilen Bedingungen unter einer Zellkulturarbeitsplatte. Dafür wurde eine Petrischale mit 2-3 ml RPMI 1640 vorbereitet und ein Nylonsieb darin platziert. Das freipräparierte Gehirn wurde auf dieses gelegt und mit einer Präparierschere in kleine Stücke zerlegt und mit einem gummierten Stempel einer 1 ml Insulinspritze zerdrückt bis nur noch weißes Bindegewebe verblieb. Das Sieb wurde anschließend mit 1 ml RPMI 1640 gespült. Anschließend wurde die Suspension 3 mal mit 5 ml RPMI 1640 gewaschen (800g für 10 min mit Bremse und Anlaufgeschwindigkeit 9). Das entstandene Zellpellet wurde in 5 ml RPMI 1640 aufgenommen, auf einem Rüttelmischer in Suspension gebracht und im Kühlschrank bei 4°C aufbewahrt. Hieraus wurde ein 10 µl Aliquot zur Ermittlung der relativen Zellzahl mittels Neubauer Zählkammer entnommen.

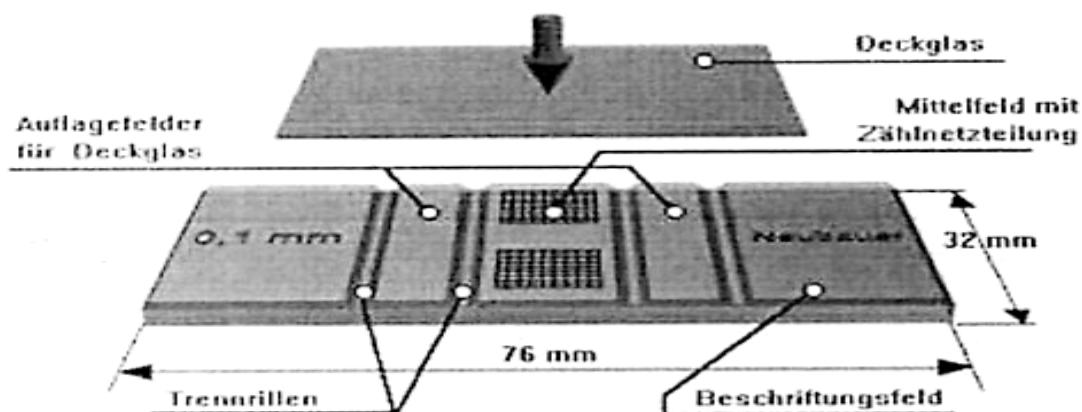


**Abbildung 3.3: Schädel und Gehirn der Maus**

Sicht auf den Schädel der Maus von dorsal. Die rote Linie auf dem Os parietale bezeichnet die Schnittführung zur Eröffnung des Schädels (*linkes Bild*) und Freilegung des Cerebrums und Cerebellums (*rechtes Bild*) (Hummel KP et al. 1941; Popesko P et al. 1990).

### 3.2 Zellzählung

Die quantitative Bestimmung der korpuskulären Bestandteile einer Zellsuspension ist eine der wesentlichen Voraussetzungen für die korrekte Durchführung zell- und molekularbiologischer Versuche. Die Ermittlung der Zellzahl der gewonnenen Suspensionen aus Milz, KM und Gehirn erfolgte bei dieser Arbeit mit einer Zählkammer nach Neubauer (Abb. 3.4). Sie dient zur mikroskopischen Auszählung korpuskulärer Elementen einer Flüssigkeitsprobe. Die hieraus ermittelte Zahl erlaubt unter Bezug auf das bekannte Kammervolumen und den Grad der Probenverdünnung die Bestimmung der Einzelemente pro Volumeneinheit.



**Abbildung 3.4: Zählkammer nach Neubauer**

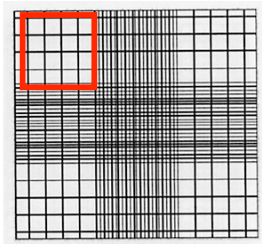
(Institut der Klinischen Chemie und Molekularen Diagnostik, Marburg 1999)

Die praktische Durchführung der Zellzählung erfolgte nach folgenden Arbeitsschritten: Nach gründlichen Reinigen der Zählkammer mit 70%igen Ethanol und Klinwipes- Präzisionstücher wurde ein Aliquot (10µl) der Zellsuspension auf diese aufgetragen. Diese Probe wurde zuvor mit PBS im Verhältnis 1:10 verdünnt. Die Zählkammer wurde nun mit einem Deckgläschen abgedeckt. Dabei musste dieses mit genügend Druck auf die dafür vorgesehenen Auflagefelder an der Zählkammer gepresst werden bis an dieser Stelle bei schräg einfallendem Licht ein regenbogenartiger Schleier zu erkennen war, die so genannten Newtonschen Ringe. Somit war die Kammer richtig verschlossen und besaß ein konstantes Kammervolumen. Überschüssige Flüssigkeit lief durch die Trennrillen ab. Unter dem Lichtmikroskop mit einem 40er Objektiv wurden die Zellen ausgezählt. Dabei

bezog sich die Zellzählung auf die vier großen Eckquadrate, bestehend aus 4 x 4 kleinen Quadraten, der Kammer (*Abb. 3.5; rote Markierung*).

Berechnung: 
$$\frac{\text{Gezählte Zellen}}{\text{Fläche} \times \text{Kammertiefe} \times \text{Verdünnung}} = \text{Zellen / mm}^3$$

Pro Eckquadrat ergibt sich aus einer Kammerhöhe von 0,1 mm und einer Seitenlänge von jeweils 1 mm ein Kammervolumen von 0,1 mm<sup>3</sup>.



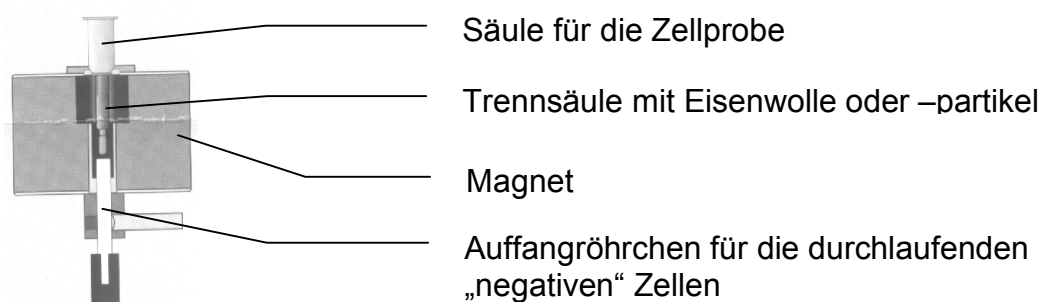
**Abbildung 3.5: Zählnetzbereich der Zellzählkammer nach Neubauer**

Der Zählnetzbereich gliedert sich in 9 Quadratfelder von je 1 mm Kantenlänge. Das mittlere davon enthält die Netzeinteilung nach Thoma. Die restlichen 8 Felder bestehen aus kleinen Quadraten der Kantenlänge 0,25 mm (*Institut der Klinischen Chemie und Molekularen Diagnostik, Marburg 1999*).

### 3.3 Magnetic Activated Cell Sorter (MACS)

#### 3.3.1 Prinzip

Die Methode der Zellseparation basiert auf der Markierung von Oberflächenmolekülen durch an Eisen gekoppelte Antikörper und der anschließenden Trennung in einer, einem magnetischen Feld ausgesetzten, Metallwollsäule (*Abb. 3.6*). „Positive“ Zellen, d.h. das gesuchte Oberflächenmolekül tragende Zellen, verbleiben durch die Magnetwirkung in der Säule. „Negative“, den gesuchten Marker nicht tragende Zellen durchlaufen diese ungehindert. Anschließend wird die Trennsäule dem Magnetfeld entnommen und gespült. Diese Flüssigkeitsprobe enthält nun ausschließlich Zellen mit den gesuchten Markern.



**Abbildung 3.6: MACS – Separator mit Säule im Magnetfeld**  
(*Miltenyi Biotec Protocol 2000*)

### 3.3.2 Methodischer Ablauf

Nach Ermittlung der Zellzahl einer Zellsuspension wurde diese in 10 ml MACS- Puffer, bestehend aus 0,5% BSA und 2 mM EDTA in PBS (*Miltenyi Biotec Protocol 2000*), aufgenommen und bei 1000 rpm für 10 min bei 4°C gewaschen. Danach wurden je  $1 \times 10^7$  Zellen aus KM und Milz 90 µl MACS- Puffer und 10 µl B220-(CD45R)- MicroBeads (*Miltenyi Biotec Protocol 2000*) hinzugefügt und für 15 min bei 4 – 8°C inkubiert. Anschließend wurde das Volumen um das 10fache durch Zugabe des MACS- Puffers erhöht und gewaschen (1000 rpm, 10 min bei 4°C). Danach wurden je  $1 \times 10^7$  Zellen 500 µl MACS- Puffer hinzu gegeben und auf die zuvor mit Puffer gespülte Säule im Separator aufgetragen. Nach dem Durchlaufen der Zellsuspension durch die Säule wurde diese mit 3 x 350 µl MACS- Puffer gespült. Danach wurde die Säule aus dem Magnetfeld im Separator entnommen und zweimal mit je 1 ml MACS- Puffer unter Druck eines Stempels einer Spritze in ein Röhrchen gepresst. Darin befanden sich nun die B220-(CD45R)- positiven Zellen. Die Zellzahl wurde mit der Zählkammer nach Neubauer bestimmt. Aus dieser Probe und aus der Zellsuspension vor der MACS- Separation wurde jeweils ein Aliquot mit je  $1 \times 10^6$  Zellen für die FACS- Kontrolle entnommen. Durch diese Kontrolle konnte anschließend der Reinheitsgrad der MACS- Aufreinigung bestimmt werden. Abschließend wurden die aufgereinigten Zellen bei 1000 rpm für 10 min bei 4°C zentrifugiert und in 1 ml PBS auf Eis aufgenommen.

## 3.4 Fluorescence Activated Cell Scan (FACS)

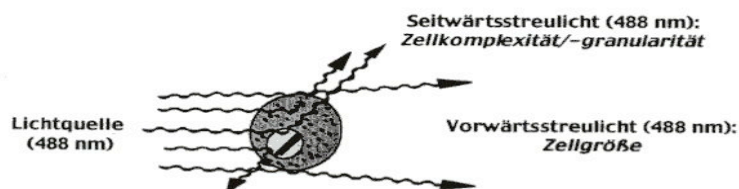
### 3.4.1 Prinzip

Die analytische Durchflußzytometrie ermöglicht die Messung der relativen Größe, der relativen Granularität bzw. der internen Komplexität und der relativen Fluoreszenzintensität von korpuskulären Bestandteilen einer Flüssigkeitsprobe. Dies ermöglicht eine qualitative Bestimmung der Zellsubpopulationen in einer Zellsuspension auf der Grundlage von



Streulicht- und Fluoreszenzeigenschaften. An Antikörper konjugierte Fluoreszenzfarbstoffe erkennen an der Zelloberfläche exprimierte Strukturen und ermöglichen so die Differenzierung und Typisierung der verschiedenen Populationen von Zellen.

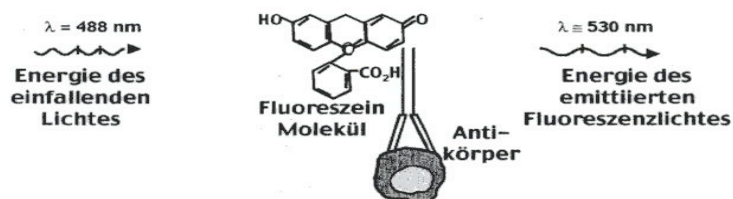
Die Größe der verschiedenen Zellen wird anhand der Vorwärtslichtstreuung (FSC) ermittelt. Sie verhält sich proportional zur Zellgröße, gemessen entlang der Achse des einfallenden Lichtes (Abb. 3.7). Fällt Licht auf die inneren Strukturen der Zelle ein, wird es gebrochen bzw. reflektiert und zur Seite hin abgelenkt. Das Seitwärtsstreulicht (SSC) wird in einem 90° Winkel zum einfallenden Licht gemessen und verhält sich proportional zur Zellgranularität (Abb. 3.7).



**Abbildung 3.7: Prinzip der Messung von Größe und Granularität im FACS- Scan**

Tangential auf die Zelloberfläche auftreffendes Licht wird entlang der Achse des einfallenden Lichtes gestreut (Lichtbeugung) und verhält sich proportional zur Zellgröße. Das auf die inneren Strukturen der Zelle einfallende Licht wird zur Seite hin abgelenkt (Lichtbrechung, Reflexion) und verhält sich proportional zur Zellkomplexität bzw. -granularität (Becton Dickinson Immunocytometry Systems 1998).

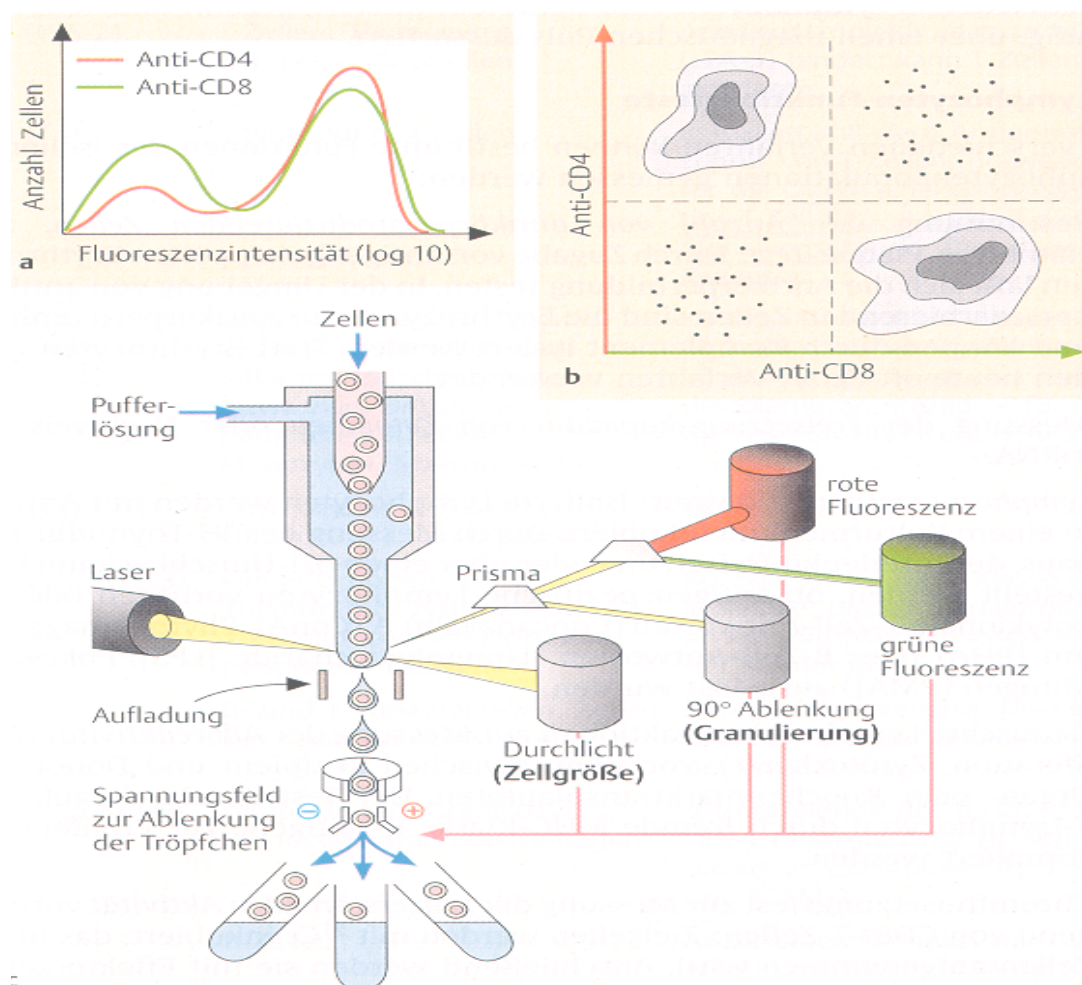
Das Fluoreszenzlicht entsteht durch die Absorption der Energie des einfallenden Lichtes durch das Fluorochrommolekül. Die absorbierte Energie wird einerseits durch Vibration und Wärme andererseits durch die Emission eines Photons in höherer Wellenlänge abgegeben. Dieses Emissionsspektrum (Fluoreszenzspektrum) ist abhängig von der jeweiligen Molekularstruktur des Fluorochroms (Abb. 3.8). Die Intensität des gemessenen emittierten Lichtes steht in direkter Proportionalität zur Zahl der gebundenen Fluorochrommolekülen.



**Abbildung 3.8: Schema der Funktionsweise von Fluorochrome- Molekülen**

Ein an einen Antikörper gebundenes Fluorochrommolekül (hier: Fluoreszein, FITC) absorbiert die Energie des einfallenden Lichtes und emittiert Licht höherer Wellenlänge (Becton Dickinson Immunocytometry Systems 1998).

Für diese Arbeit wurden zwei Fluorochrome verwendet. Fluoreszein-isothiocyanat (FITC) mit einem Emissionsspektrum von 530 nm und Phycoerythrin (PE) mit einem Spektrum des emittierten Lichtes von 560 nm. Die Messung erfolgte im FACS-Scanner. Dieser besteht aus 3 Komponenten, einem Flüssigkeitssystem, welches Zellen zuführt und diese im Messpunkt fokussiert, einer Optik, die mit einem 488 nm Laser die Zellen anregt und mit einer Sammellinse das emittierte Licht auffängt, und der Elektronik, welche die optischen Signale in relative elektronische Signale umwandelt und digitalisiert (*Prinzip der Messung, Abb. 3.9*).



**Abbildung 3.9: Prinzip der analytischen Durchflußzytometrie**

Dieses Schema veranschaulicht am Beispiel der Messung von CD8- positiven (*grün*) und CD4- positiven (*rot*) Zellen die Funktionsweise der fluoreszenz- aktivierten Zellanalyse (FACS). Dargestellt ist die Fluoreszenzintensität gegenüber der Anzahl der Zellen (a) und rote Fluoreszenzintensität gegen grüne Fluoreszenzintensität (b) (Kayser et al. 1998)

### 3.4.2 Methodischer Ablauf

Mittels FACS wurden zum einen Zellen aus der Nativ- Zellsuspension von Milz und KM, um die verschiedenen Zellpopulationen nachzuweisen, und zum anderen Zellen nach MACS- Aufreinigung, um den Aufreinigungsgrad zu bestimmen, gemessen. Pro Doppelfärbung mit FITC- und PE- Fluorochromen wurden je  $1 \times 10^6$  Milz- und KM- Zellen verwendet. Diese wurden mit 2 ml Cellwash<sup>®</sup> und bei 1000 rpm für 5 min bei 4°C in der Zentrifuge gewaschen. Danach wurde der Flüssigkeitsüberstand über dem Zellpellet dekantiert, das Pellet in 100 µl Cellwash<sup>®</sup> aufgenommen und mit 1 µl Mausserum für 15 min bei RT unter Lichtabschluß inkubiert. Die Proteine des Mausserums sollen sich an geladenen Proteinstrukturen der Zellen lagern, um eine anschließende Fehlbindung zwischen Antikörper und geladener Struktur durch elektrostatische Wechselwirkungen zu verhindern. Nach der Inkubation wurden die Zellen wie oben beschrieben erneut gewaschen und der Überstand dekantiert. Den Zellen wurde nun 100 µl Cellwash<sup>®</sup> und je 1 µg fluorochromassoziierte Antikörper bzw. Antikörper für die Isotypenkontrolle pro  $1 \times 10^6$  Zellen (*BD Biosciences, PharMingen Technical Data Sheets 1998 - 2001*) in FITC und PE hinzugefügt. Anschließend wurden die Zellen für 15 min bei RT unter Lichtabschluß inkubiert. Nach erneuten Waschen und Dekantieren des Überstandes wurde das Pellet in 500 µl PBS aufgenommen und mit einem Rüttelmischer in Suspension gebracht.

### 3.4.3 Messung

Die Messung erfolgte mittels des FACScan<sup>®</sup>- Gerätes und der CellQuest<sup>®</sup>- Software am Computer. Anhand der Isotypenkontrolle und der Lage der Fluoreszenz- Signale der einzelnen Populationen wurden die Parameter der Kompensation für die Messung eingestellt. Mit dieser Kompensation wurde die gesamte Analyse durchgeführt und anschließend mit Hilfe des Computers ausgewertet.

### 3.5 Molekularbiologische Methodik

#### 3.5.1 RNA – Gewinnung

Die Gewinnung der RNA stellte neben einer exakten Zellgewinnung und -zählung eine der wichtigsten Voraussetzungen für die erfolgreiche Durchführung molekularbiologischer Experimente dar.

Vor dem Start der RNA- Extraktion wurde ein Zell- Lyse- Puffer angesetzt. Dafür wurden 10 µl β- ME auf 1000 µl RLT- Puffer gegeben (*Qiagen RNeasy® Mini Handbook 2001*).  $1 \times 10^7$  Zellen aus Milz oder KM, die durch MACS nach CD45R(B220) aufgereinigt worden waren, oder aus dem Gehirn wurden mit 10000 rpm (8000 g) für 15 sec. bei RT zentrifugiert. Das überstehende Medium wurde abgesaugt und dem Pellet 600 µl des zuvor angesetzten Lyse- Puffers hinzu gegeben (*Qiagen RNeasy® Mini Handbook 2001*). Dieses Lysat wurde auf die QIAshredder®- Säule zur DNA- Strang-Brechung transferiert und mit maximaler Geschwindigkeit für 2 min bei RT zentrifugiert. Dem entstandenen Durchlauf wurden 600 µl Ethanol hinzugefügt. Diese Probe wurde nun auf die RNeasy®- Spin- Säule gegeben und für 15 sec. mit 10000 rpm bei RT zentrifugiert, der entstandene Durchlauf wurde verworfen. Für den anschließenden DNA- Verdau wurden 10 µl DNase I mit 70 µl RDD- Puffer angesetzt, auf die RNeasy®- Spin- Säule gegeben und für 15 min bei RT inkubiert. Nach der Inkubation wurden 350 µl RW1- Puffer auf die Säule gegeben, für 15 sec mit 10000 rpm bei RT zentrifugiert und der Durchlauf verworfen. Die Säule wurde nun auf ein neues 2 ml Röhrchen umgesetzt und es wurden 500 µl RPE- Puffer hinzugefügt, für 15 sec mit 10000 rpm bei RT zentrifugiert. Der Durchlauf wurde wiederum verworfen. Es folgte eine weitere Waschung mit 500 µl RPE- Puffer mit maximaler Geschwindigkeit für 2 min in der Zentrifuge. Danach wurde die Säule auf ein neues 1,5 ml Röhrchen gesetzt, 40 µl RNase freies Wasser hinzugefügt und für 1 min mit 10000 rpm bei RT zentrifugiert.

Ob das Röhrchen nun geeignete Gesamt- RNA in ausreichender Menge enthielt, wurde mit zwei verschiedenen Methoden kontrolliert.

Die erste Qualitätskontrolle wurde mit dem Gene Quant II RNA-/ DNA-Kalkulator, einem Photometer, durchgeführt und dabei die Gesamt- RNA-Konzentration in  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$  ( $\text{g}/\text{l}$ ) ermittelt.

Die zweite Qualitätskontrolle wurde mittels einer Agarosegelelektrophorese ermittelt. Hierbei war zu beachten, dass alle Kammerbestandteile der Elektrophoresekammer RNasefrei waren. Ein 5  $\mu\text{l}$  Aliquot der extrahierten RNA wurde nun mit 10  $\mu\text{l}$  RNA- Proben- Puffer und 3,3  $\mu\text{l}$  einer 6fachen Gel-Loading- Solution versetzt (*Sigma Protokoll 1998*) und für 10 min bei 65°C inkubiert. Nach der Inkubation wurde die Probe sofort auf Eis für 2 – 5 min zur Unterbrechung der Reaktion gelagert. Danach wurde die RNA- Probe auf ein 1%iges Agarosegel aufgetragen und für 2 Std. bei 150 mA und 100 V elektrophoretisch getrennt.

### 3.5.2 Transkription der RNA in DNA

Damit die gesuchte Zielinformation in der PCR amplifiziert werden kann, muß die zuvor gewonnene RNA in DNA, der so genannten cDNA umgeschrieben werden. Für diese Arbeit wurden standardmäßig 0,25 – 0,3  $\mu\text{g}$  extrahierte RNA verwendet (*Invitrogene Life Technologies 1999*). Das Schlüsselenzym für diese Reaktion ist die Reverse- Transkriptase, die an einen RNA- Strang einen komplementären DNA- Strang synthetisiert. Die Reverse-Transkriptase dieser Arbeit war die SuperScript™ II RNase H<sup>minus</sup> Rev. T. (*Invitrogene Life Technologies 1999*). Dieses Enzym zeichnet sich dadurch aus, dass es nicht signifikant durch rRNA und tRNA beeinflusst wird und keine RNase H- Aktivität besitzt, die während der Synthese des komplementären DNA- Stranges die RNA zerstören und somit die Reaktion nachhaltig beeinträchtigen würde.

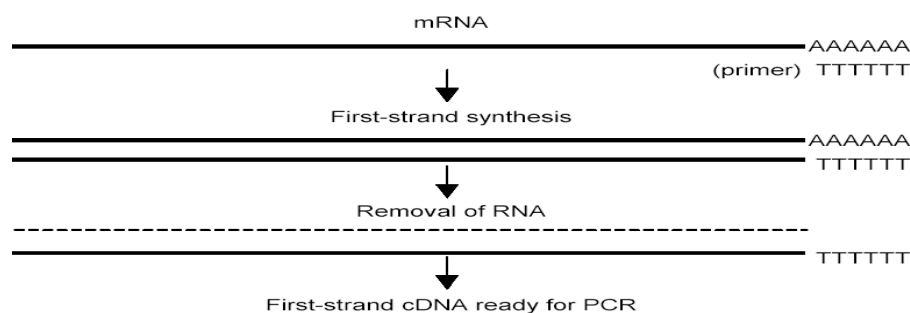
Für eine cDNA- Synthese (*Abb. 3.10*) gibt es 3 verschiedene Möglichkeiten: eine unspezifische, eine spezifische und eine genspezifische Möglichkeit.

Die unspezifische Methode, die auch für diese Studie Verwendung fand, verwendet „Random Hexamere“, Primer mit einer hohen Varianz ihrer Basen. Diese Methode wird in der Regel dann verwendet, wenn die einzelne gesuchte mRNA in ihrer Gesamtheit schwer zu kopieren ist. Diese „Random Hexamere“ lagern sich gemäß ihrer Basenanordnung an die

unterschiedlichsten Stellen der RNA an, so dass die cDNA- Synthese an mehreren Stellen beginnen kann. So kann auch eine maximale Größe der cDNA garantiert werden. Nachteilig ist der Umstand, dass die gesamte und nicht nur die gesuchte mRNA in cDNA umgeschrieben wird.

Die spezifische Methode verwendet Oligo(dT)- Primer, die gezielt an der mRNA bindet, da nur diese einen Poly(A)- Schwanz besitzt. Nachteilig ist die geringere Komplexität und Größe der cDNA als bei der unspezifischen Methode.

Die genspezifische Methode verwendet Gen- Spezifische- Primer (GSP) und beinhaltet die Sequenz- Information der Ziel- cDNA.



#### Abbildung 3.10: cDNA- Synthese

Dieses grobe Schema verdeutlicht die wichtigsten Syntheseschritte. Primer binden an die RNA. Durch die Reverse Transkriptase entsteht ein komplementärer cDNA- Strang, der mit der RNA ein DNA- RNA- Hybrid darstellt. Durch eine RNase H aus *E. coli* wird die RNA abgebaut. (*Invitrogene Life Technologies 1999*)

Eine parallel zur cDNA- Synthese durchgeführte Non- Rev.-T.- Kontrolle beinhaltet RNA und dieselben Reagenzien wie die eigentliche Probe außer der Rev. T. Diese Negativ- Kontrolle darf sich in der PCR nicht amplifizieren, da sie keine cDNA enthalten darf. Sie zeigt somit eine Kontamination der ursprünglichen RNA- Proben mit Fremd- DNA auf, wonach die Ergebnisse der PCR verworfen werden müssen. In einem 0,5 ml RNase- freien Eppendorf- Röhrchen wurden folgende Reagenzien zusammengestellt:

<u>Komponenten</u>	<u>Probe</u>	<u>Non- Rev.-T.- Kontrolle</u>
RNA- Probe	n µl (0,25- 0,3 µg)	n µl (0,25- 0,3 µg)
Random Hexamere	1 µl	1µl
10mM dNTP- mix	1 µl	1µl
DEPC treated water	Auf 10 µl	Auf 10 µl
<b><u>Gesamtansatz</u></b>	<b>10 µl</b>	<b>10 µl</b>

**Tabelle 3.1: RNA- Primer- Ansatz** (*Invitrogene Life Technologies 1999*)

Die Ansätze wurden für 5 min bei 65°C auf einem Thermocycler Trioblock inkubiert und danach sofort auf Eis für 1 min gelagert, um die laufende Reaktion der Primeranlagerung zu unterbinden. In der Inkubationszeit wurde der Reaktionsmix mit der Rev. T. hergestellt.

<u>Komponenten</u>	<u>Volumen</u>
10 x Rev. T.- Puffer	2 µl
25 mM MgCl <sub>2</sub>	4 µl
0,1 M DTT	2 µl
RNase OUT™ Rekombinanter Ribonuclease Inhibitor	1 µl
<b><u>Gesamtansatz</u></b>	<b>9 µl</b>

**Tabelle 3.2: cDNA- Reaktionsansatz** (*Invitrogene Life Technologies 1999*)

Zu je einem RNA- Primer- Gemisch von 10 µl wurde ein Reaktionsmix von 9 µl hinzugefügt. Dieser Ansatz wurde mit einer Pipette vermischt und kurz mit 10000 rpm zentrifugiert. Danach erfolgte eine Inkubation bei 25°C für 10 min und dann bei 37°C für 2 min. Nach der Inkubation wurde 1 µl (50 Einheiten) SuperScript™ II RNase H<sup>minus</sup> Rev. T. der Reaktion hinzu gegeben und für 50 min bei 37°C inkubiert. Durch das Erhitzen auf 70°C für 15 min wurde die Reaktion der Rev. T. unterbrochen, die Probe danach sofort auf Eis gelagert und anschließend kurz bei 10000 rpm zentrifugiert. Dem Ansatz wurde nun 1 µl RNase H aus E. coli zum Abbau der RNA hinzugefügt und bei 37°C für 20 min inkubiert. Die Probe wurde anschließend mit nukleasefreiem Wasser auf ein 100 µl Eluat aufgefüllt. Für die PCR wurden jeweils nur 10% (10µl) des 100 µl cDNA- Eluats verwendet (*Invitrogene Life Technologies 1999*).

### 3.5.3 Qualitative Polymerase- Ketten- Reaktion (PCR)

Die Polymerase Ketten Reaktion (PCR) ist heutzutage die wichtigste biotechnische Innovation und hat sich als fester Standard in molekularbiologischen Experimenten etabliert.

Ursprünglich entwickelt vom Team um H. Ghobind Khorana in den frühen 70er Jahren als eine Strategie, das Labor bei der Gen- Synthese arbeitstechnisch zu entlasten (*Kleppe K. et al. 1971*), wurde diese Idee in der Mitte der 80er Jahre mit der Entdeckung der thermostabilen DNA-

Polymerase (*Saiki R.K. et al. 1988*) aus dem Archäo- Bakterium *Thermus aquaticus* wieder aufgegriffen und automatisiert.

### 3.5.3.1 Prinzip

Der Prozess der PCR beinhaltet 3 Elemente (*Abb. 3.11*): Denaturierung (*Denaturation*) der DNA durch Hitze, Anlagerung (*Annealing*) der Oligonukleotid- Primer an die komplementäre DNA- Sequenz und die Erweiterung/ Polymerisation (*Extension*) der angelagerten Primer durch die DNA- Polymerase (*Irwin N. et al 2001*).

- Denaturierung (*Denaturation*):  
Während der Denaturierung werden die DNA- Stränge bzw. die DNA- Oligonukleotid- Primer- Hybride in Einzelstränge aufgetrennt, so dass sich im darauf folgenden Schritt wieder Oligonukleotid- Primer anlagern können. Die Temperatur zur Denaturierung der DNA bzw. Hybride ist im Wesentlichen abhängig vom Gehalt ihrer C- und G- Basen, da diese 3 Wasserstoffbrückenbindungen innerhalb eines Stranges zueinander ausbilden. Je höher der Gehalt an C- und G- Basen, desto höher muß die Denaturierungstemperatur sein. Limitiert wird diese Schmelztemperatur durch die verwendete Taq- DNA- Polymerase, deren höchste tolerable Temperatur bei 94 – 95°C liegt. Aus diesem Temperaturbereich ergeben sich auch Konsequenzen für das Design der Oligonukleotid- Primer, da diese mit ihrer komplementären DNA- Zielsequenz Hybride bilden. Der optimale Primer sollte nicht länger sein als 18 – 25 bp, wobei er sich in der Länge der Vorwärts- und Rückwärts- Sequenz nicht mehr als 3 bp unterscheiden sollte (*Irwin N. et al 2001*). Der Gehalt an C- und G- Basen sollte zwischen 40% und 60% liegen, dabei ist eine komplementäre Basenkomposition (> 3 bp) innerhalb eines Primers oder zwischen den Partnern eines Primer- Paares und eine inverse Wiederholungssequenz zu vermeiden (*Irwin N. et al 2001*), um der Entstehung von Dimeren entgegen zu wirken. Für die Berechnung der nötigen Schmelztemperatur  $T_m$  für Primer- Paare von 15 – 20 bp Länge in Abhängigkeit ihrer Basenzusammensetzung kann die so



genannte „Wallace- Regel“ (*Suggs et al. 1981; Thein and Wallace 1986*) verwendet werden:

$$T_m \text{ (in } ^\circ\text{C)} = 2(A+T) + 4(G+C)$$

Die berechnete  $T_m$  eines Primers sollte nicht mehr als  $5^\circ\text{C}$  von der des Partners und nicht mehr als  $10^\circ\text{C}$  vom amplifizierten Produkt differieren und nicht über  $94 - 95^\circ\text{C}$  liegen, da dies die Taq-Polymerase zerstören würde.

- Anlagerung der Primer (*Annealing*):

Bei diesem Schritt hybridisieren die Oligonukleotid- Primer mit den beiden DNA- Matrizensträngen und dienen dem darauf folgenden Schritt der Polymerisation der Taq- Polymerase als Startmolekül. Hierbei spielen die gewählte Temperatur  $T_a$  und die Inkubationszeit eine wichtige Rolle (*Gassen et al. 1994*). Diese werden durch die Basenzusammensetzung sowie der Länge und Konzentration der Primer beeinflusst. Empfohlen wird eine  $T_a$  von  $5^\circ\text{C}$  unter der  $T_m$  der verwendeten Primer- Paare (*Irwin N. et al 2001*). Allgemein liegt die  $T_a$  in einem Bereich von  $50 - 72^\circ\text{C}$ . Bei dieser Arbeit lag die ausgetestete  $T_a$  für alle verwendeten Primer bei  $59^\circ\text{C}$ . Für die PCR sind die jeweils höchsten  $T_a$ 's vorzuziehen, da so die korrekte Anlagerung der Oligonukleotiden an den Matrizenstrang und damit die Spezifität der Reaktion gefördert wird (*Gassen et al. 1994*). Denn eine zu niedrige  $T_a$  würde die Zahl unspezifischer Produkte durch Fehlanlagerung erhöhen und eine zu hoch gewählte  $T_a$  würde die Anlagerung der Primer an die Zielsequenz nachhaltig stören.

- Erweiterung/ Polymerisation (*Extension*):

In dieser Phase der Reaktion kommt es zur Kopierung des Matrizenstranges durch die Taq- Polymerase. Die Temperatur  $T_e$  dieses Schrittes ist vom Temperaturoptimum der jeweils verwendeten DNA- Polymerase abhängig. Die Taq- Polymerase dieser Arbeit stammt aus *Thermus aquaticus*, kloniert in *E. coli* (EC 2.7.7.7), mit

einem Temperaturoptimum von 72°C (*Qiagen HotStarTaq™ PCR Handbook 1999*). Höhere Temperaturen könnten zwar die Aktivität des Enzyms steigern, beinhalten jedoch die Gefahr einer Denaturierung von Matrize und Primer. Je nach eingestellten Bedingungen beträgt die Synthesegeschwindigkeit 35 – 150 Nukleotiden/ sec. (*Gassen et al. 1994*). Daher reicht eine Extensionszeit von ca. 0,5 – 1 min für bis zu 2 kBp große Fragmente aus. Zu lange Zeiten erhöhen die Zahl der unspezifischen Nebenprodukte. Die Syntheserichtung der Extension verläuft immer vom 5'-Ende zum 3'-Ende.

In den ersten beiden Zyklen entstehen bei der Polymerisation DNA-Moleküle, deren 5'-Ende zwar durch den eingesetzten Primer begrenzt ist, deren 3'-Ende durch den möglichen Abbruch der Polymerisation an jeder beliebigen Stelle der Matrize sehr unterschiedlich aussehen kann (*Gassen et al. 1994*). Im nächsten, dritten Zyklus ist das erste Matrizenmolekül entstanden, dessen Länge der Länge der gesuchten DNA- Sequenz, begrenzt durch die Bindungsstellen der beiden Primer, entspricht. Da sich die Konzentration der Ausgangsmatrize nicht ändert, nimmt die Anzahl dieser Moleküle mit definiertem 5'- und 3'-Ende mit der Zykluszahl zu. Ab diesem dritten Zyklus verläuft die Amplifikation der Produkte exponentiell:

$$N_f = N_0 (1 + Y)^n \quad (\text{Keohavong et al. 1988})$$

( $N_f$  entspricht der Anzahl der Kopien der amplifizierten Sequenz nach  $n$  Zyklen;  $N_0$  ist die initiale Anzahl der Kopien der Zielsequenz im DNA- Ansatz;  $Y$  ist die Effizienz der Amplifikation pro Zyklus)

Nach 20 Zyklen ergibt sich eine theoretische Anreicherung der Amplifikationsprodukte ca. um den Faktor  $10^6$ . Aus einem DNA-Molekül können theoretisch etwa 1 Millionen identische Kopien entstehen. Da jedoch die Ausbeute von Zyklus zu Zyklus variiert, also nicht bei 100% liegt, sondern bei ca. 85%, entstehen nur etwa  $10^5$  Kopien (*Gassen et al. 1994*). Grund dafür ist, dass nach ca. 20 – 25 Zyklen die Amplifikation nicht mehr exponentiell, sondern linear zunimmt. Diese Plateau- Phase ist bedingt durch die ständig wachsende Konzentration der Matrizenstränge, die nicht mehr in der

vorgegebenen Zeit durch die Primer besetzt werden können, sowie einer Renaturierung der Matrizensträngen und durch die nachlassende Aktivität der Taq- Polymerase:

$$Y = (N_f/N_0)^{1/n} - 1 \quad (\text{Keohavong et al. 1988})$$

(Y ist die Effizienz der Amplifikation pro Zyklus;  $N_f$  und  $N_0$  beschreiben die amplifizierte Anzahl der Moleküle in n Zyklen der exponentiellen Phase produziert.)

Für den letzten Zyklus wird eine längere Extensionszeit (ca. 10 min) verwendet. Dies soll eine Komplettierung aller amplifizierten PCR-Produkte ermöglichen.

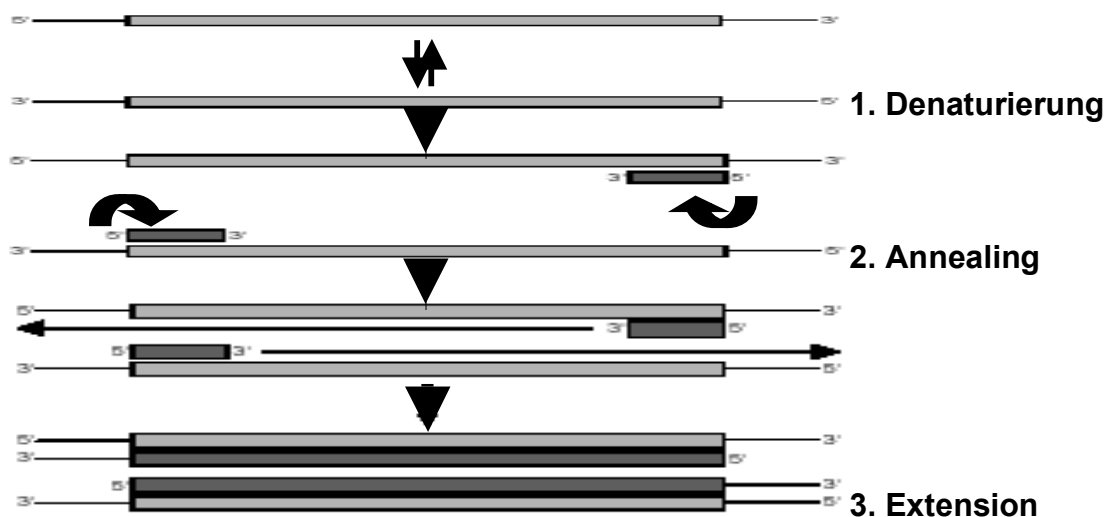


Abbildung 3.11: Schema eines PCR- Zyklus

Für die erfolgreiche Durchführung der PCR sind folgende essentiellen Komponenten unerlässlich:

- Thermostabile Taq- DNA- Polymerase: Sie katalysiert an das 3'- Ende eines Primers in Anwesenheit einer DNA- Matrize die Anlagerung von Desoxyribonukleosidtriphosphaten.

Molekulargewicht	94000 DA
pH- Optimum	7 – 8,8
Temperaturoptimum	70 – 80°C
Ionenabhängigkeit	10 mM Mg <sup>2+</sup>
Polymerisationsgeschwindigkeit	Ca. 35 - 150 Nukleotiden/ s
Halbwertszeit	130 min bei 92,5°C
3'5'- Exonukleaseaktivität	Keine

Tabelle 3.3: Taq- Polymerase Eigenschaften (Gassen et al. 1994).

Anzumerken ist, dass der Taq- Polymerase die 3'5'- Exonukleaseaktivität zur Exzision 3'- fehlgepaarter Basen, wie dies bei der DNA- Polymerase I der Fall ist, fehlt. Zudem können keine Fehlerkorrekturen vorgenommen werden. Pro 5000 Nukleotiden wird ein falsches Nukleotid eingebaut (0,25%), dabei ist der Fehler über das gesamte Produkt verteilt und beschränkt sich nicht auf eine Stelle der Sequenz (*Gassen et al. 1994*). Vorwiegender Fehler ist der Basenaustausch (bevorzugt C gegen T), strukturelle Aberrationen sind dagegen sehr selten.

- Oligonukleotid- Primer: Ihre Basenzusammensetzung, Länge und Konzentration sind bestimmend für eine erfolgreiche PCR- Reaktion (*man siehe bitte Unterpunkt „Denaturierung“, der sich auch mit der Struktur und Zusammensetzung der Primer beschäftigt.*)
- Desoxyribonukleosidtriphosphate (dNTP): Sie fungieren als Bausteine bei der Extensionsphase. Ihre Addition an den Matrizenstrang wird durch die Taq- Polymerase katalysiert. Üblicherweise werden 200 – 250 µM eines jeden dNTPs (dATP, dCTP, dTTP, dGTP) in Reaktionen mit der Taq- Polymerase bei 1,5 mM MgCl<sub>2</sub> verwendet. Höhere Konzentrationen können die Reaktion nachhaltig beeinflussen, indem sie Mg<sup>2+</sup> der Reaktion entziehen. Bei den Experimenten dieser Arbeit wurde eine 1,5 mM MgCl<sub>2</sub>- Fertiglösung verwendet (*Qiagen HotStarTaq™ PCR Handbook 1999*).
- Divalente Kationen: Alle thermostabilen DNA- Polymerasen benötigen freie divalente Kationen, bevorzugt Mg<sup>2+</sup>. Da Mg<sup>2+</sup> von dNTPs und den Oligonukleotid- Primern gebunden wird, muß deren Konzentration größer sein als die Konzentration der dNTPs und der Primer zusammen (*Irwin N. et al. 2001*). Zu hohe Konzentrationen an Mg<sup>2+</sup> erhöhen die Zahl unspezifischer Produkte (*Krawetz et al. 1989; Riedel et al. 1992*).
- pH- Wert: Standardmäßig ist der pH- Wert der 8,3 – 8,7 eingestellt. In dieser Arbeit wurde ein PCR- Puffer mit dem pH- Wert von 8,7 verwendet (*Qiagen HotStarTaq™ PCR Handbook 1999*).
- DNA- Matrizenstrang: In diesen Experimenten wurde cDNA aus extrahierter RNA als Matrizenstrang verwendet (*siehe 3.5.1 u. 3.5.2*).

### 3.5.3.2 Methodische Durchführung

Das Ansetzen der PCR- Komponenten erforderte ein Arbeiten unter sterilen Bedingungen. Zudem musste das Ansetzen des Reaktionsgemisches und die PCR- Produkt- Analyse räumlich getrennt sein, um eine Kontamination des Reaktionsgemisches mit DNA- Produkten aus der PCR- Reaktion zu vermeiden.

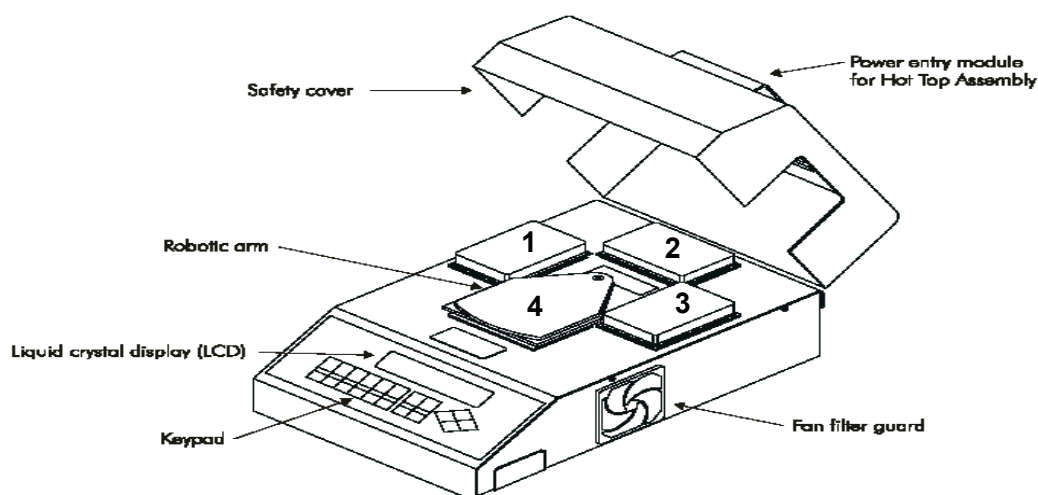
Das Schlüsselenzym dieser Versuchsanordnung war die HotStarTaq<sup>™</sup> - DNA- Polymerase (*Qiagen HotStarTaq<sup>™</sup> PCR Handbook 1999*), deren besondere Eigenschaft darin bestand, dass sie bei niedrigen Temperaturen ohne vorherige Aktivierung keine Polymeraseaktivität besaß. Erst durch einen initialen Aktivierungsschritt (15 min bei 95°C) wurde sie durch die Zerstörung eines inhibierenden Antikörpers aktiviert. Dies verhinderte beim Ansetzen des Reaktionsgemisches die Bildung von Fehlprodukten und Primer-Dimeren, da die nicht inhibierte Taq- Polymerase schon bei RT aktiv ist (0,25 Nukleotide/ s) (*Gassen et al. 1994*). Standardmäßig wurde eine Taq- Polymerase- Konzentration von 1,25 Einheiten pro Reaktion (0,25µl) und eine Mg<sup>2+</sup>- Konzentration von 1,5 mM angesetzt. Als DNA- Matrice wurden 10% (10 µl) des 100 µl Eluats aus der cDNA- Synthese und der Negativ- Rev. T.- Kontrolle verwendet. Folgende Reagenzien wurden in ein 0,5 ml RNase- freien, sterilen Eppendorf- Röhrchen zusammengefügt:

Reagenzien	Volumen	Finale Konzentration
10facher PCR- Puffer	5 µl	1fach (1,5 mM Mg <sup>2+</sup> )
dNTP- Mix	1 µl	200 µM pro dNTP
HotStarTaq <sup>™</sup>	0,25 µl	1,25 Units/ Reaktion
Primer (Vorwärts)	0,5 µl	0,1 – 0,5 µM
Primer (Rückwärts)	0,5 µl	0,1 – 0,5 µM
RNase- freies Wasser	32,75 µl	-
cDNA- Probe	10 µl	< 1 µg/ Reaktion
<b>Gesamtvolumen</b>	<b>50 µl</b>	-

**Tabelle 3.4: PCR- Reaktionsansatz** (*Qiagen HotStarTaq<sup>™</sup> PCR Handbook 1999*)

Die finale Mg<sup>2+</sup>- Konzentration bei diesem Ansatz beträgt 1,5 mM, die der dNTPs 200 µM je Nukleotid. Jedem Ansatz wurden gemäß Standard 1,25 Units Taq- Polymerase hinzugefügt.

Dieser Reaktionsansatz wurde mittels einer Pipette vermischt und in ein PCR- Reaktionsgefäß für den RoboCycler® (Abb. 3.12) übertragen. Der Vorteil dieses Thermal- Cyclers bestand darin, dass parallel 4 Heiz- bzw. Kühlplatten mit konstanter Temperatur ( $T_m$ ,  $T_e$ ,  $T_a$ , Kühlung bei 4°C) verwaltet werden können. Durch einen mechanischen Arm konnten die Proben auf die entsprechende Platte mit der einprogrammierten Temperatur ohne Zeitverlust durch Abkühl- oder Heizvorgänge transferiert werden.



**Abbildung 3.12: RoboCycler® Thermal- PCR- Cycler**

Block 1 für die Denaturation (94 – 95°C), Block 2 für die Primer- Anlagerung (50 – 62°C), Block 3 für die Extension (68 – 72°C), Block 4 für die Kühlung nach erfolgter Amplifikation (4°C) (Stratagene RoboCycler® Instruction Manual 2001).

Der thermale PCR- Cycler wurde mit folgenden Temperaturen und Zeiten für diese Studie programmiert:

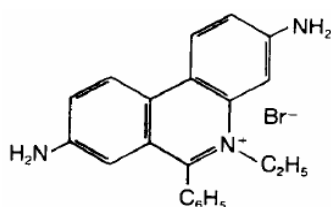
PCR- Bedingungen		
Zyklenzahl	Temperatur	Zeitintervall
Initiale Aktivierung der Taq- Polymerase 1 x	95°C	15 min
42 x	94°C	30 s
	59°C	30 s
	72°C	1 min
Finale Extension 1 x	72°C	10 min
Lagerung/ Kühlung	4°C	Max. 1 d

**Tabelle 3.5: PCR- Einstellungen und Reaktionsbedingungen für den thermalen RoboCycler®** Die Annealing- Temperatur  $T_a$  wurde experimentell ermittelt. 59°C stellte für alle verwendeten Primer die vorteilhafteste  $T_a$  dar. (Qiagen HotStarTaq™ PCR Handbook 1999)

Nach Beendigung der Amplifikation wurden die Proben bei 4°C im Cycler gelagert. Zur qualitativen Kontrolle der entstandenen Produkte wurde die Methodik der Agarosegelelektrophorese angewendet.

### 3.5.4 Agarosegelelektrophorese

In der Agarosegelelektrophorese werden die in der PCR amplifizierten DNA-Sequenzen in einem elektrischen Feld der Größe nach aufgetrennt. Die DNA als ein Polyanion wandert wegen der überwiegend negativ geladenen Phosphatreste von der Kathode (-) zur Anode (+). In der Gelmatrix aus Agarose- Polysacchariden, in Abhängigkeit von der jeweiligen Konzentration des Gels, werden die DNA- Produkte nach ihrer Länge aufgetrennt. Dabei ist die Wanderungsgeschwindigkeit und die Laufstrecke dieser Produkte umgekehrt proportional zu ihrer Größe. Zur Detektion der Fragmente im Gel wird Ethidiumbromid (*Abb. 3.13*), welches zwischen den Basen der DNA interkaliert, verwendet. Dieses fluoresziert unter UV- Licht und macht so die DNA- Produkte zur Analyse sichtbar. Eine parallel dazu verlaufende DNA-Leiter, welche aus einem Gemisch von DNA- Fragmenten spezifischer Größe und damit bekannter Laufweite im Gel besteht, läßt eine Aussage über die Größe der zuvor amplifizierten DNA- Proben zu.



**Abbildung 3.13: Molekülstruktur des Ethidiumbromids** (*Roche 2004*)

Für diese Studie wurde ein 1%iges Agarosegel verwendet. Dafür wurde 1 g Agarose in 100 ml TBE- Puffer (1:10 verdünnt) gelöst und in einer Mikrowelle so lange zum Kochen gebracht bis eine klare Suspension entstanden ist. Diese Lösung wurde dann mit 2 µl Ethidiumbromid versetzt und blasenfrei in die dafür vorgesehene PCR- Wanne gegossen. Ein Kamm im noch heißen Gel sorgte für die notwendigen Kammern, in denen die PCR- Produkte transferiert wurden. Nach Aushärtung des Gels wurde dieses in die Elektrophoresekammer gelegt und diese Kammer mit TBE- Puffer (1:10 verdünnt) geflutet. Dabei war zu beachten, dass die Kammern des Gels zur

Kathode ausgerichtet waren, da die DNA im elektrischen Feld zur Anode wandert. 25 µl der PCR- Proben wurden nun mit 2,5 µl Gel Loading Solution vermischt und in die Kammern des Gels pipettiert. Zur genaueren Analyse wurden zusätzlich noch eine 50 bp und 100 bp Leiter, Gemische mit DNA-Fragmenten spezifischer Größe, hinzugefügt, um eine Aussage über die entstandene Größe der PCR- Produkte treffen zu können. Nach Verschließen der Elektrophoresekammer wurde ein elektrisches Feld mit folgenden Parametern angelegt:  $U = 100 \text{ V}$ ,  $I = 150 \text{ mA}$ ,  $P = 50 \text{ W}$ .

Die Laufzeit richtete sich nach der sichtbaren Wanderungsgeschwindigkeit der Gel Loading Solution, mit der die PCR- Produkten versetzt worden sind. Nach Beendigung der elektrophoretischen Auftrennung wurde das Gel unter UV- Licht analysiert und mittels Fotografie dokumentiert.

### 3.5.5 Quantitative PCR mittels LightCycler®

#### 3.5.5.1 Prinzip

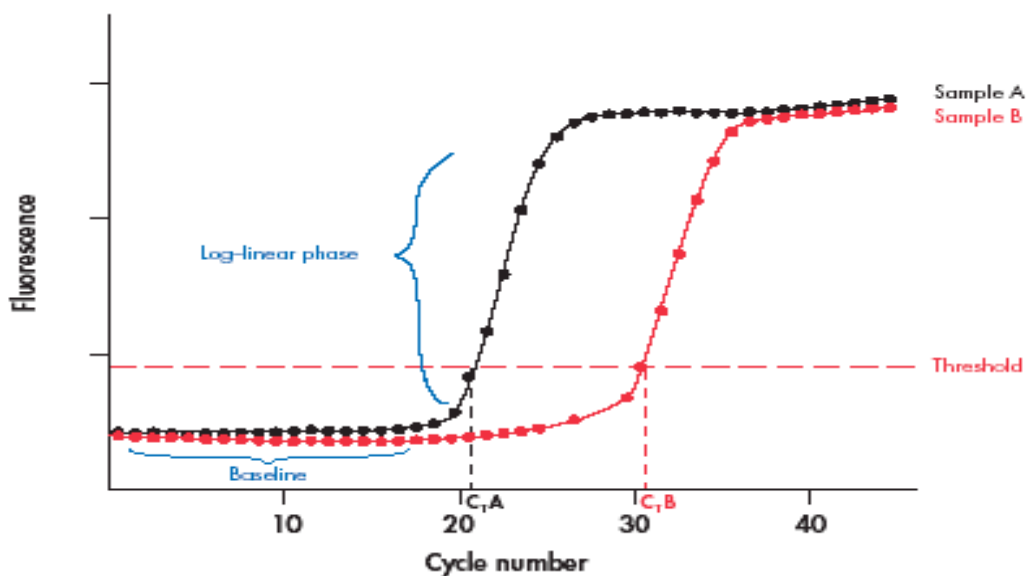
Die quantitative PCR beruht auf denselben Prinzipien wie die qualitative PCR: Denaturation, Anlagerung und Extension (*siehe Kap. 3.5.3.1*). Mit ihrer Hilfe ist es möglich, sowohl relative wie auch absolute Mengen eines DNA-Moleküls zu bestimmen. Besonders, um Rückschlüsse auf den Gehalt der durch die Zelle exprimierte RNA zu ziehen, hat sich die quantitative PCR bewährt. Da sich mit Hilfe der Taq- Polymerase die Ausgangs- DNA in jedem Zyklus verdoppelt, ist es möglich, aus der Menge des Amplifikates den Gehalt der Matrizen- DNA zu bestimmen. Dies gilt aber nur für den Bereich des exponentialen Zuwachses an Amplifikations- DNA in den ersten 10 - 20 Zyklen. Durch den Verbrauch an dNTPs und die nachlassende Aktivität der Taq- Polymerase verläuft die Amplifikation bei höherer Zyklenzahl nicht mehr exponential und läßt keine eindeutige Bestimmung des Ausgangsmaterials mehr zu.

Das grundlegende Prinzip der quantitativen PCR beruht auf dem Vergleich der zu analysierenden RNA, umgeschrieben in cDNA, mit einem Standard-DNA- Molekül (*Gassen et al. 1994*). Dabei wird die Standard- DNA als Referenz jeder PCR- Reaktion hinzu gegeben. Für ein Quantifizierungsexperiment werden verschiedene Reaktionen angesetzt, die



immer dieselbe Menge an cDNA, aber unterschiedliche Menge an Standard-DNA enthalten. Nach der Amplifikation kann die Mengenabschätzung mittels Agarosegelelektrophorese oder durch radioaktive Verfahren durchgeführt werden.

Die Versuche dieser Studie wurden mit den quantitativen Verfahren und der Methodik der Real- Time- PCR (kinetische PCR) durchgeführt. Diese Methodik basiert auf Fluoreszenzmarkierung von DNA- Strängen in der laufenden Amplifikation und macht über Computerberechnungen diese deutlich. Mit der Zunahme der Amplifikationsprodukte nimmt die Fluoreszenzintensität zu. Umso höher der ursprüngliche Gehalt an Matrizen-DNA in der Probe ist, desto weniger Amplifikationszyklen sind nötig bis die Plateauphase, graphisch dargestellt vom Computer (Abb. 3.14), erreicht ist (Becker et al. 1996; Gibson et al. 1996; Heid et al. 1996; Freeman et al. 1999).

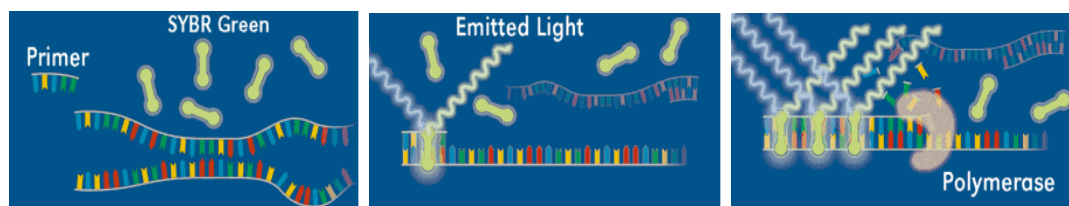


**Abbildung 3.14: Zunahme der Fluoreszenzintensität in der Amplifikation**

Die Probe A enthält mehr Matrizen- DNA zu Beginn der Amplifikation als die Probe B. Aus diesem Grunde sind weniger Zyklen notwendig, um die Plateauphase zu erreichen. Die Basislinie (Baseline) bezeichnet die ersten Zyklen, typischerweise zwischen Zyklus 3 bis 15, in denen es zu keinem detektierbaren Anstieg der Fluoreszenzintensität kommt. Die Schwelle (Threshold) ist in der Log- Phase lokalisiert. Diese Schwelle, durch den Computer vorgegeben oder manuell eingestellt, bezeichnet die Stelle, an der der erste eindeutig detektierbare Anstieg der Fluoreszenzintensität liegt. Der Zyklus, in dem die Fluoreszenzintensität die Schwelle erreicht, wird Schwellen- Zyklus (Threshold- Cycle;  $C_T$ ) genannt (Qiagen QuantiTect™ SYBR® Green PCR Handbook 2002).

Um den Amplifikationsvorgang sichtbar zu machen, wurde in dieser Studie der Fluoreszenzfarbstoff SYBR® Green I (Wittwer C.T. et al. 1997a), der spezifisch an alle entstehende Doppelstrang- DNA bindet (Abb. 3.15),

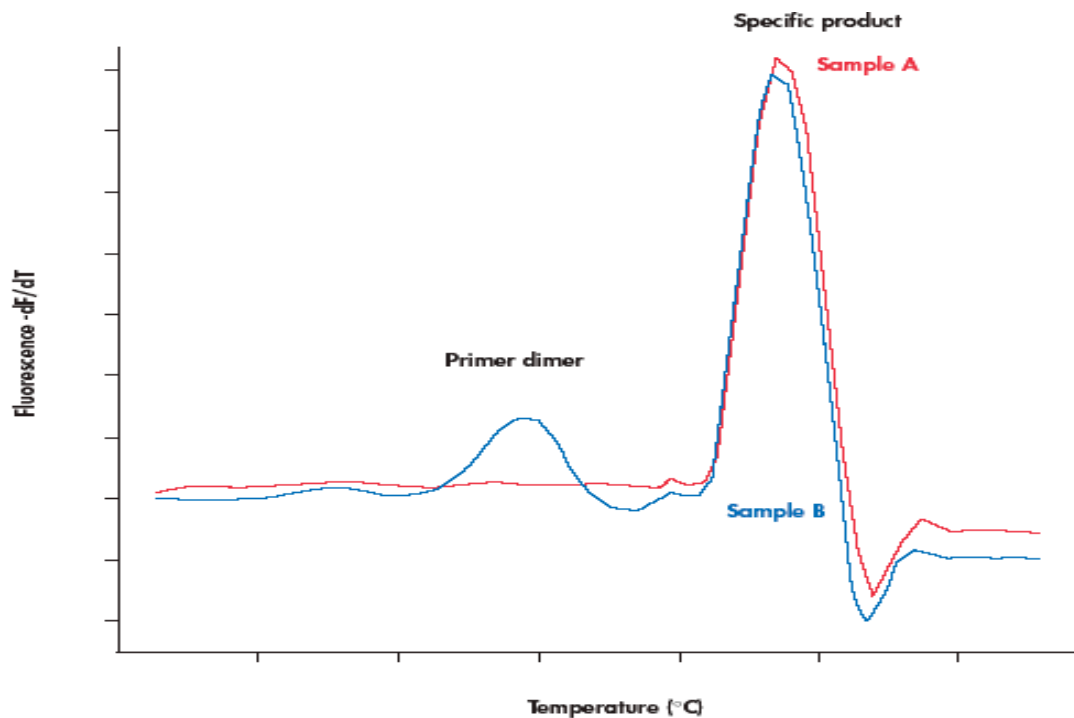
unabhängig von der eingesetzten Matrizen- DNA oder der Primer (*Irwin N. et al. 2001*). Das Anregungsmaximum von SYBR® Green I liegt bei 497 nm, sein Emissionsmaximum bei 521 nm. Da sich der Farbstoff an jedes entstehende DNA- Molekül bindet und unabhängig ist von der Art des entstehenden Amplifikationsproduktes, entwickelt sich die Fluoreszenzintensität proportional zur entstehenden DNA- Masse mit einer hohen Sensitivität (*Irwin N. et al. 2001*).



**Abbildung 3.15: SYBR® Green I- Farbstoff**

Dieses Schema verdeutlicht die Funktionsweise der Fluoreszenzmarkierung in der laufenden Amplifikation. SYBR® Green I bindet nicht an DNA- Einzelstränge, sondern lagert sich zwischen Primer und DNA- Strang bzw. im Doppelstrang im Sinne eines interkalierenden Farbstoffes an. Bei laufender Synthese des komplementären Stranges durch die Polymerase lagert sich fortlaufend dieser Farbstoff im Doppelstrang an. Die Fluoreszenzintensität nimmt zu (*Roche Diagnostics Cooperation 2004*).

Ein Problem stellen aus diesem Grunde nicht spezifische amplifizierte Produkte oder Primer- Dimere dar. Um die Spezifität der amplifizierten Produkte der kinetischen PCR zu überprüfen, wurde in dieser Arbeit die Schmelzkurven- Analyse (*Abb. 3.16*) angewandt. Dabei wird die Temperatur langsam von ca. 60°C bis auf die Schmelztemperatur  $T_m$  (95°C) erhöht. Bei niedrigen Temperaturen liegen alle PCR- Produkte als Doppelstrang vor. In diesem Stadium ist SYBR® Green I gebunden und die Fluoreszenzintensität hoch. Während der Denaturierung der PCR- Produkte lösen sich die Doppelstränge in Einzelstränge, was zu einem langsamen Nachlassen der Fluoreszenzintensität führt, da sich auch der Fluoreszenzfarbstoff aus der Bindung löst. Ist die Schmelztemperatur der entstandenen PCR- Produkte, spezifische wie nicht spezifische, erreicht, nimmt die detektierte Fluoreszenzintensität sehr schnell ab, da die Moleküle bei ihrer  $T_m$  schneller denaturieren. Diese schnelle Abnahme wird vom Computer in der ersten mathematischen Ableitung ( $-dF/dT$ ) berechnet und als ein Gipfel dargestellt (*Abb. 3.16*).



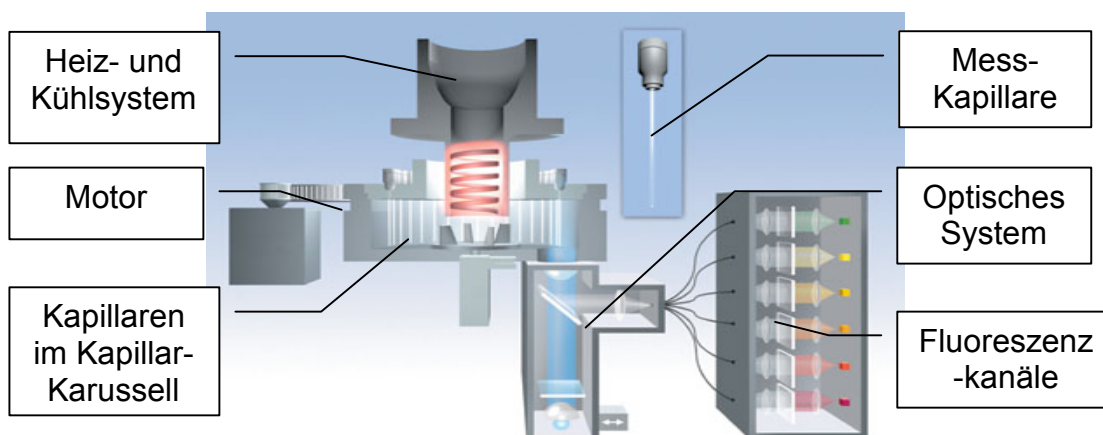
**Abbildung 3.16: Schmelzkurvendarstellung in der ersten mathematischen Ableitung**

In der ersten Ableitung ( $-dF/dT$ ) kann eine rapide Abnahme der Fluoreszenzintensität als Gipfel dargestellt und in der Graphik einer Temperatur ( $^{\circ}\text{C}$ ) zugeordnet werden. So lässt sich die Spezifität der Amplifikation überprüfen. In der vorliegenden Graphik zeigt die Probe A einen Gipfel, der sich der spezifischen  $T_m$  des amplifizierten Produktes zuordnen lässt. Hier wurde das gesuchte Matrizenmolekül amplifiziert. In der Probe B zeigt sich zudem ein Gipfel bei niedrigeren Temperaturen. In dieser Probe haben sich Primer- Dimere gebildet, die die gemessene Fluoreszenzintensität während der Amplifikation verfälschen (*Qiagen QuantiTect™ SYBR® Green PCR Handbook 2002*).

Lässt sich dieser Gipfel der spezifischen Schmelztemperatur des PCR-Produktes zuordnen, so ist das gesuchte DNA- Molekül amplifiziert worden. Gipfel, die sich einer niedrigeren Temperatur zuordnen lassen, zeigen Primer- Dimere (*Abb. 3.16*) auf. Diese denaturieren aufgrund ihrer kürzeren Länge bei einer niedrigeren Schmelztemperatur (*Ririe et al. 1997*). Mehrere Gipfel mit verschiedenen  $T_m$ s oder Plateau- Bildungen in der Schmelzkurvendarstellung sind dagegen ein Zeichen für die Amplifikation von nicht spezifischen Produkten.

Zur Durchführung der kinetischen PCR wurde in dieser Arbeit der LightCycler® Thermal- Cycler (*Abb. 3.17*) verwendet. Dieser Thermal- Cycler besteht aus mehreren Einheiten: einem Kapillarhalter, einem Motor, der die Kapillaren zur Fluoreszenzabtastrung vor das optische System positioniert, und einem Heiz- und Kühlsystem. Verbunden mit einem Rechner werden die gemessenen Fluoreszenzintensitäten aus dem optischen System in digitale Signale übersetzt und als Graphik dargestellt. Diese Graphik wird den

permanenten Messungen angepasst und zeigt immer den aktuellen Status der Amplifikation an.



**Abbildung 3.17: LightCycler®- System**

Kernstück des LightCyclers ist das Kapillarkarussell mit den Kapillaren, die die Proben enthalten, im Heiz- Kühl- Turm. Die Kapillaren werden durch einen Motor vor das optische System positioniert, so dass eine permanente Fluoreszenzmessung möglich ist. Die Amplifikation wird somit über die Messung der Fluoreszenzintensität in „Echtzeit“ verfolgt (Roche Diagnostics Cooperation 2004).

### 3.5.5.2 Methodische Durchführung

Das Schlüsselenzym dieser Versuchsanordnung war die HotStarTaq™ - DNA-Polymerase (Qiagen HotStarTaq™ PCR Handbook 1999). Diese musste durch einen initialen Inkubationsschritt von 15 min bei 95°C aktiviert werden (siehe 3.5.3.2). Folgende Reagenzien wurden in ein 0,5 ml RNase- freien, sterilen Eppendorf- Röhrchen zusammengefügt:

Reagenzien	Volumen	Finale Konzentration
SYBR® Green I Master Mix	10 µl	1 x
Primer (vorwärts)	1 µl	0,1 – 0,5 µM
Primer (rückwärts)	1 µl	0,1 – 0,5 µM
cDNA- Probe	1 µl	< 1 µg/ Reaktion
RNase- freies Wasser	7 µl	-
<b>Gesamtvolumen</b>	<b>20 µl</b>	<b>-</b>

**Tabelle 3.6: PCR- Reaktionsansatz für das LightCycler® System**

Der SYBR® Green I Master Mix beinhaltet eine finale  $Mg^{2+}$ - Konzentration bei diesem Ansatz von 2,5 mM, 1,25 Units der HotStarTaq- Polymerase, die der dNTPs 200 µM je Nukleotid (Qiagen QuantiTect™ SYBR® Green PCR Handbook 2002).

Standardmäßig wurde eine Taq- Polymerase- Konzentration von 1,25 Einheiten/ Reaktion (0,25µl) und eine  $Mg^{2+}$ - Konzentration von 2,5 mM in

Form des SYBR® Green I Master Mix angesetzt. Dieser Master Mix enthielt 200 µM pro dNTP. Als DNA- Matrize wurde eine 1:10 verdünnte Probe aus der cDNA- Synthese und der Negativ- Rev. T.- Kontrolle verwendet. Dieser Ansatz wurde mittels einer Pipette durchmischt und in die Kapillaren transferiert, welche in das Kapillar- Karussell gesteckt und anschließend dem LightCycler®- System zugefügt worden sind. Jenes System wurde mit folgenden PCR- Parametern programmiert:

PCR- Bedingungen des LightCycler®			
Zyklenzahl	Temperatur	Zeitintervall	Heizgeschwindigkeit
1x Taq- Polymerase Aktivierungsschritt	95°C	15 min	20°C/ sec
55 x	94°C	15 sec	20°C/ sec
	55°C	25 sec	20°C/ sec
	72°C	25 sec	20°C/ sec
1 x Finale Extension	72°C	2 min	20°C/ sec
1 x Schmelzkurven- Analyse	60°C – 95°C	(Vorgabe des Programms)	20°C/ sec
Lagerung/ Kühlung	4°C	Max. 1 d	20°C/ sec

**Tabelle 3.7: PCR- Bedingungen des LightCycler® Systems**  
(Qiagen QuantiTect™ SYBR® Green PCR Handbook 2002).

### 3.5.5.3 Auswertung am Computer

Die Auswertung der erhobenen Messdaten wurde mit der LightCycler Software Version 3.5 durchgeführt. Besonderes Augenmerk wurde auf die Schmelzkurvenanalyse gelegt, da diese Aufschluß über die Spezifität der Amplifikationsprodukte lieferte.

## 4. Ergebnisse

### 4.1 Charakterisierung der C57BL/6 Wildtyp- Maus

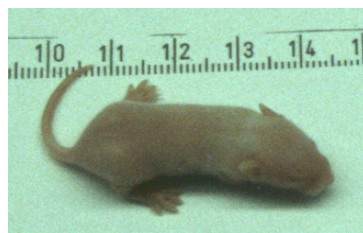
Diese hier im Kapitel 4.1 ermittelten Merkmale sollen die Organentwicklung und Größenordnung der ermittelten Zellzahlen einer 17 Tage alten C57BL/6 Wildtyp- Maus zum Zeitpunkt des Präparationsbeginns beschreiben und das Versuchstier charakterisieren. Diese erhobenen Daten – Zellzahlen sowie der Grad der körperlichen Entwicklung - einer Maus ohne NT- oder NT-Rezeptor- Defekt sollen unter anderem als Grundlage für einen Vergleich mit Mausstämmen mit bekannten und klar definierten Defekten dienen, um eventuelle Einflüsse der Neurotrophine sowie deren Rezeptoren auf die körperliche Reifung und die B- Zell- Lymphopoese im Anschluß diskutieren zu können.

#### 4.1.1 Präparation, Zellzählung und Zellgewinnung

Eine sorgfältige Präparation von Milz, Gehirn und KM mit anschließender Gewinnung der Zellen stellte die Grundvoraussetzung für die, in dieser Arbeit erzielten, zell- und molekularbiologischen Ergebnisse dar.

Für jeden Versuch wurden sechs 17 Tage alte Wildtyp C57/BL6 Mäuse, unabhängig des Geschlechtes, verwendet und, wie in *Kapitel 3.1.3 – 3.1.5* dargestellt, präpariert. Die Organe wurden vor der endgültigen Präparation und Isolierung mononukleären Zellen gewogen, um den körperlichen Entwicklungsstand der Versuchstiere zu dokumentieren.

Zum Zeitpunkt der Präparation sind die Wildtyp- Mäuse ca. 4 – 5 cm groß, gemessen vom Os sacrum bis zum Os nasale (*Abb. 4.1*).

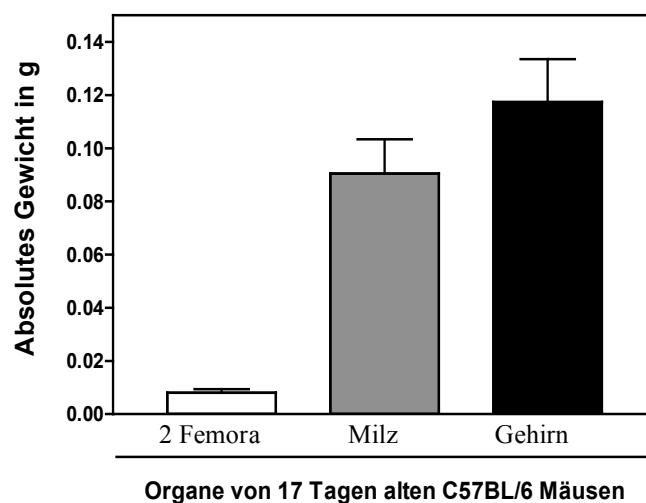


**Abbildung 4.1: 17 Tage alte C57BL/6 Wildtyp- Maus**

Die Versuchstiere sind zu dem Zeitpunkt der Präparation ca. 4,5 cm, gemessen vom Schwanzansatz bis zur Schnauze, groß.

Bei einem Lebensalter von 17 Tagen einer unter pathogenfreien Bedingungen aufgezogenen C57BL/6- Maus beträgt das durchschnittliche Gewicht der Milz ca. 0,09 g, das des Gehirns ca. 0,11 g und das Gewicht zweier Femora 0,008 g (*Abb. 4.2*). Um einen Näherungswert des Gewichtes des verwendeten KM ermitteln zu können, wurden pro Maus 2 Oberschenkelknochen präpariert und zusammen gewogen.

Die angegebenen durchschnittlichen Gewichtsangaben stellen einen MW  $\pm$  SD von  $n = 6$  Versuchstieren dar.

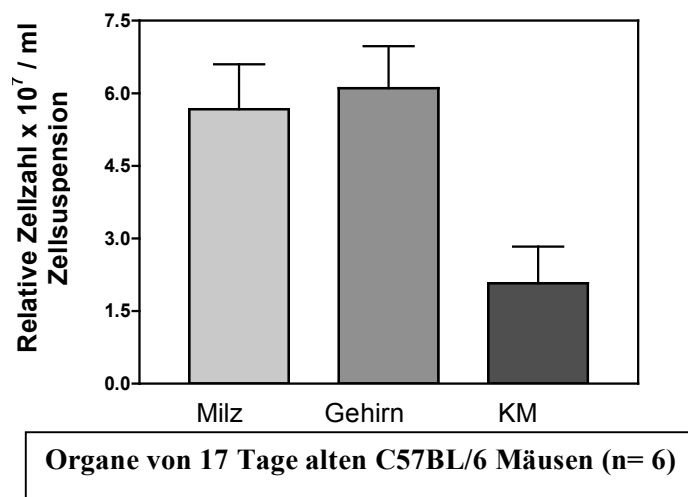


**Abbildung 4.2: Durchschnittliche Gewicht von Gehirn, Milz und zweier Femora von 17 Tagen alten C57BL/6 Wildtyp Versuchstier- Mäusen**

Aufgetragen gegen Gewicht in Gramm [g] sind jeweils Milz, Gehirn und zwei Oberschenkelknochen von 6 Versuchstieren. Die etwas größeren Schwankungen des Gewichtes beim Gehirn lassen sich durch die schwierigeren Präparationsbedingungen des Schädels erklären, die dazu führten, dass das Gehirn nicht immer vollständig herausgelöst werden konnte. Um einen Näherungswert des Gewichtes des KM ermitteln zu können, ist hier das Gewicht zweier Oberschenkelknochen pro Versuchstier angegeben. Dargestellt sind Mittelwerte  $\pm$  SD von  $n = 6$  Jungtieren pro Versuch.

Die Ermittlung der relativen Zellzahlen aus diesen Organkompartimenten erfolgte, wie in *Kapitel 3.2* dargestellt, mittels der Zählkammer nach Neubauer. Diese Zahlen spiegeln den relativen Gesamtzellgehalt/ ml Suspension der einzelnen Organe von Wildtyp- Versuchstieren in diesem juvenilen Entwicklungsstadium von 17 Tagen, abzüglich des Bindegewebes, welches durch die Präparation und Aufbereitung mittels des Nunc- Siebes entfernt wurde, wieder. Hinsichtlich des KM wurde der Zellgehalt repräsentativ aus 2 Oberschenkelknochen pro Versuchstier ermittelt (*Abb. 4.3*).

Die durchschnittlichen Zellzahlen einer Milz betragen  $5,67 \times 10^7$ / ml Zellsuspension, der des Gehirns  $6,10 \times 10^7$ / ml und der von 2 Femora  $2,07 \times 10^7$ / ml. Diese Werte geben die MW  $\pm$  SD von n = 6 Versuchstieren wieder.



**Abbildung 4.3: Relative Zellzahlen der präparierten Organe 17 Tage alter C57BL/6 Mäuse**

Aufgetragen sind die mittels Neubauer Zählkammer ermittelten Zellzahlen nativer Zellen der einzelnen Organe nach der Präparation und vor der weiteren Aufreinigung. Die relative Zellzahl aus dem KM ergibt sich aus der Zählung zweier Oberschenkelknochen pro Versuchstier. Angegeben sind Mittelwerte  $\pm$  SD von n = 6 Jungtieren, 17 Tage alt.

Im Anschluß an die Erhebung der Gesamtzellzahl wurden die mononukleären Zellen – hauptsächlich aus Lymphozyten, Monozyten und Makrophagen bestehend - aus Milz und KM extrahiert. Diese wurden mittels Dichtegradientenzentrifugation mit Lympholyte<sup>®</sup>-M (siehe Kap. 3.1.4) und anschließende Zellzählung nach Neubauer (Kap. 3.2) gewonnen. Mit dieser Methode ist es möglich, die vitalen Zellen von der apoptotischen Zellfraktion sowie von den Erythrozyten einer Suspension zu trennen und überdies die für diese Studie interessante Population der Lymphozyten zu separieren.

Der Reinheitsgrad der gewonnenen Fraktion, an der Interphase des Trennmediums entnommen, beläuft sich auf >90% (Biozol Diagnostica and Linaris GmbH 2000). Die Kontaminationswahrscheinlichkeit der Interphase beträgt mit dieser Methode 1 bis max. 5% (Tab. 4.1).



Phase im Trennmedium	Mononukleäre Fraktion	Kontamination
Obere Phase	< 1%	0%
Interphase	> 90%	1 - 5%
Untere Phase	< 10%	1 – 5%
Pellet	< 1%	> 90%

**Tabelle 4.1: Reinheitsgrad und Kontaminationswahrscheinlichkeit nach Extraktion der mononukleären Zellfraktion mit Lympholyte®-M**

Die an der Interphasengrenze entnommenen mononukleären Zellen haben einen Reinheitsgrad von über 90%. Die Kontamination mit Fragmenten, apoptotischen Zellen oder Erythrozyten beläuft sich auf 1 – 5% (*Biozol Diagnostica and Linaris GmbH 2000*).

Eine Zählung der Zellen der aufgereinigten Fraktion aus Milz und KM zeigen, dass sich der durchschnittliche Gehalt an mononukleären Zellen mit einer Größenordnung in der Milz von  $4,44 \times 10^7$  pro ml Zellsuspension und im KM aus zwei Femora von  $1,46 \times 10^7$  pro ml beziffern lässt. Diese Angaben des durchschnittlichen Zellgehaltes stellen die MW +/- SD von n = 6 Wildtyp-Mäusen dar.

Die extrahierten Zellen des ZNS wurden keiner Dichtegradientenzentrifugation und Differenzierung in die verschiedenen Subpopulationen unterworfen. Diese dienen in dieser Versuchsanordnung nur als Standard der Expression von NTs und NT-Rezeptoren bei den molekularbiologischen Studien.

Anzumerken ist, dass die Zahlen von Milz und KM untereinander nicht verglichen werden können, da das KM aus präparatorischen Gründen standardmäßig für alle Tiere nur aus den beiden Oberschenkelknochen einer Maus gewonnen wurde und somit nicht das gesamte KM repräsentieren (*Kap. 3.1.4*).

#### 4.1.2 MACS (Magnetic Activated Cell Sorting)

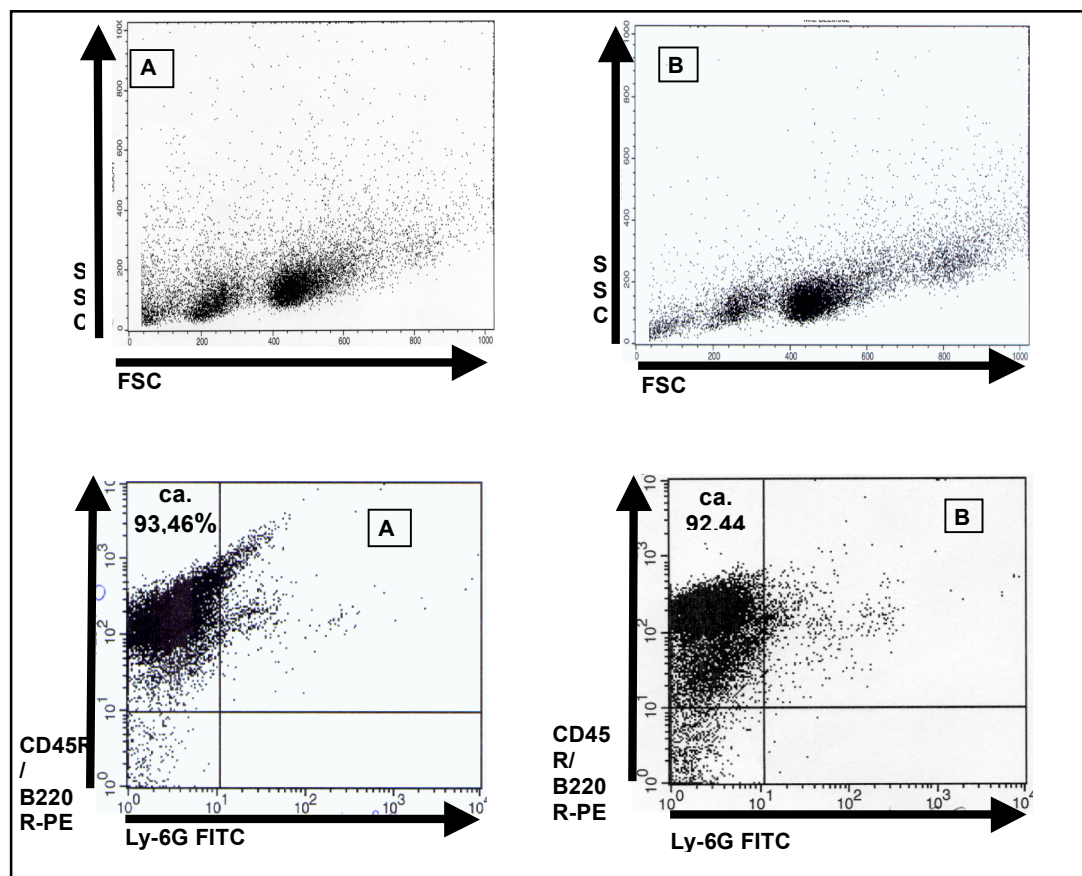
Um in den nachfolgenden molekularbiologischen Versuchen das Expressionsmuster der NTs und NT-Rezeptoren von B-Zellen bestimmen zu können, wurden diese mittels MACS aus der mononukleären Zellfraktion von KM und Milz die B-Zellen extrahiert (*siehe Kap. 3.3.2*). Standardmäßig wurden  $1 \times 10^7$  Zellen aus KM und der Milz verwendet. Als Marker für diese

Lymphozyten- Subpopulation dienten CD45R/B220- MicroBeads. Dieser CD-Marker ist auf allen B-Zell-Entwicklungsstufen exprimiert (*Melchers et al. 1999*) und kann als so genannter Pan- B- Zell- Marker für diese Versuche eingesetzt werden. Somit ist es möglich, alle diesen Cluster tragenden B-Lymphozyten zu detektieren und aus der Suspensionslösung zu entfernen. Mittels FACS- Analytik wurde der Reinheitsgrad der gewonnenen Extraktionslösung der MACS- Aufreinigung kontrolliert.

Ausgezählt wurden 10.000 Zellen, welche mit dem B-Zellmarker CD45R/B220- R-PE und dem Granulozytenmarker Ly-6G- FITC markiert wurde. In den oberen Bildern (*Abb. 4.4*) sind die Zellen nach Größe [FSC] und der Granularität [SSC] aufgetragen. Schon aus dieser Darstellung des Streulichtes läßt sich die erfolgte Aufreinigung der Zellen bewerten. Man erkennt deutlich die Lymphozytenpopulationen, die sich bei einer Vorwärtslichtstreuung [FSC] von 200 – 600 nm und einem SSC von 50 – 200 nm darstellen (*Becton Dickinson Immunocytometry Systems 1998*). Die Fraktionen der Monozyten und Granulozyten, die im Allgemeinen bei einem SSC von 300 – 1000 nm und einem FSC von 500 – 800 nm gemessen werden (*Becton Dickinson Immunocytometry Systems 1998*), sind durch die MACS- Aufreinigung zum größten Teil entfernt worden. Darüber hinaus wurden in der Messung die beiden Fluoreszenzmarker CD45R/B220 und Ly-6G gegeneinander dargestellt (*Abb. 4.4*). Zur Berechnung der relativen Häufigkeiten von Fluoreszenzsignalen wurde die Messung in 4 Quadranten unterteilt (*Abb. 4.4*), die vom Computer berechnet wurden. Das obere linke Feld erfasst die CD45R/B220- R-PE- positiven und Ly-6G- negativen Fluoreszenzsignale, welche die mit dem Pan- B- Zell- Marker B220 detektierten Zellen repräsentiert und eine Aussage über den relativen Gehalt an B-Zellen in einer MACS- aufgereinigten Zellsuspension im Vergleich mit den anderen Quadranten möglich macht. Diese Aussage ist zulässig, da die B- Zellen in jedem Stadium ihrer Entwicklung den Marker B220 exprimiert (*Melchers et al. 1999*), aber nicht Ly-6G. Das obere rechte Feld zeigt die B220- und Ly-6G- positiven Fluoreszenzereignisse an. Ly-6G- positive und B220- negative Zellen werden im unteren rechten Quadranten angezeigt. Dieses Feld erfasst somit die Kontamination der aufgereinigten Probe mit Granulozyten. Die beiden Marker nicht tragende Zellen werden vom unteren

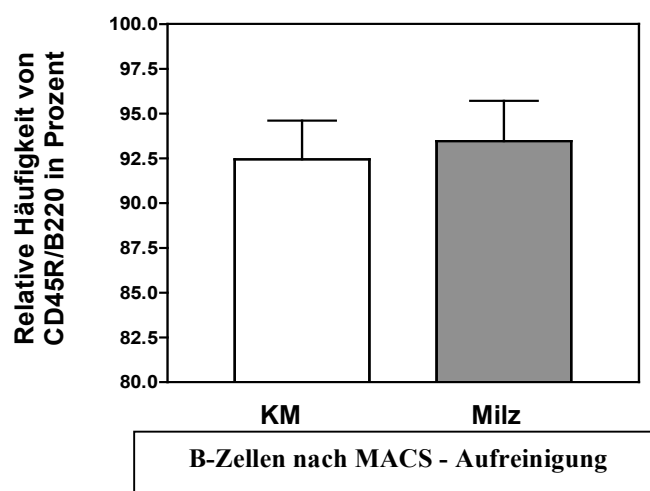
linken Messfeld erfasst, in dem sich zudem aber auch der Zelldetritus darstellt. Die Proben aus dem nach B220 im MACS aufgereinigten KM-Zellen besaßen eine durchschnittliche Reinheit – eine relative Häufigkeit an B220 positiven Fluoreszenzereignissen - von 92,44% (Abb. 4.5).

Die B-Lymphozyten aus der Milz konnten mit einer durchschnittlichen Reinheit von 93,46% extrahiert werden (Abb. 4.4 und 4.5). Diese Prozentzahlen spiegeln den MW +/- SD von n = 10 Messungen verschiedener Proben von Milz- und KM- Zellen wieder.



**Abbildung 4.4: FACS- Analyse der Reinheit der MACS- Separation nach CD45R/B220 für die Zellen der Milz [A] und des KM [B]**

Diese Abbildungen zeigen repräsentativ für mehrere Messungen die FACS- Kontrolle des erhaltenen Reinheitsgrades der MACS- Separation nach CD45R/B220 für die Zellen des KM [B] und der Milz [A]. In der oberen Zeile sind die Zellen nach Größe [FSC] und der Granularität [SSC] aufgetragen. Man erkennt deutlich die Lymphozytenpopulationen, die sich bei einer Vorwärtslichtstreuung von 200 – 600 nm darstellen (*Becton Dickinson Immunocytometry Systems 1998*). Die Fraktionen der Monozyten und Granulozyten, die sich im Allgemeinen bei einem SSC von 300 – 1000 nm darstellen (*Becton Dickinson Immunocytometry Systems 1998*), sind durch die MACS- Aufreinigung zum größten Teil entfernt worden. In der unteren Zeile sind die Zellen im Hinblick auf die Fluoreszenzsignale aufgetragen. Verglichen wurden die Fluoreszenzen von CD45R/B220- R-PE als Pan- B-Zell- Marker und Ly-6G- FITC als Granulozytenmarker. Man erkennt, dass sich mit einer durchschnittlichen relativen Häufigkeit von > 90% für die Zellen der Milz [A] und des KM [B] die Fluoreszenzereignisse im oberen linken Quadranten darstellen. Dieses Messfeld gibt die CD45R/B220- positiven und Ly-6G- negativen Fluoreszenzsignale an und repräsentiert die mit B220 markierten B-Zellen. Die angegebenen Prozentzahlen ergeben sich aus dem Mittelwert +/- SD von n = 10 verschiedenen Messungen.



**Abbildung 4.5: Reinheit der B-Zell-Extraktion durch MACS, gemessen anhand der relativen Häufigkeit an CD45R/B220- R-PE- Fluoreszenzereignissen im FACS**

Es wurden die Zellen der mononukleären Fraktionen aus KM und der Milz mit B220-MicroBeads im MACS aufgereinigt und anschließend im FACS gemessen. Dargestellt sind die relativen Häufigkeiten, der im FACS gemessenen Fluoreszenzereignisse nach CD45R/B220- R-PE- Farbstoff. Diese Häufigkeiten entsprechen der Reinheit einer Zellsuspension, deren Zellen ausschließlich den B-Zell-Marker CD45R/B220 tragen. Angegeben sind die Mittelwerte  $\pm$  SD von  $n = 10$  aufgereinigten Proben.

#### 4.1.3 FACS (Fluorescence Activating Cell Scan)

Wir stellten uns die Frage, welche Zellsubpopulationen in den beiden Kompartimenten KM und Milz vorhanden sind und in welchem qualitativen Verhältnis diese in den Organen zueinander vertreten sind. Somit werden im Hinblick auf etwaige Differenzen in der Expression der NT und NT-Rezeptoren der B-Zellen aus Milz und KM die unterschiedlichen Verteilungsmuster der Zellpopulationen in den beiden Organen berücksichtigt.

Für diese Messungen wurden standardmäßig aus einer nicht mittels Lympholyte und MACS aufgereinigten Nativzellsuspension  $1 \times 10^6$  Zellen pro FACS- Tube entnommen und für die Messung aufbereitet (siehe Kap. 3.4.2).

##### 4.1.3.1 Zellverteilung im Knochenmark

Um die Frage nach der relativen Verteilung der Zellsubpopulationen im KM beantworten zu können, haben wir ein Modell für die Messung im FACS-Scan entwickelt (Abb. 4.6). Dieses berücksichtigt die Expression spezifischer

CD- Marker auf den Zellen, die durch spezifische mit Fluorochrome gekoppelte AK detektiert wurden (*siehe Kap. 3.4.1*), und läßt eine Zuordnung relativer Häufigkeiten zu. Somit soll ein Profil der Zellzusammensetzung des KMs zum Zeitpunkt der Präparation der Versuchstiere eruiert werden. Diese sind im Einzelnen die Population der Stammzellen pro unreife Vorläuferzellen, die lymphoide Reihe, die granulozytäre Fraktion, die erythroide Zellreihe und die Population der Makrophagen. Die lymphoiden Zellen werden in B-Zellen, dem Objekt der weitergehenden molekularbiologischen Untersuchungen dieser Arbeit, in T-Zellen und in NK-Zellen in der Darstellung im FACS unterschieden.

Die Präparation und die Zellentnahme erfolgten, wie in Kap. 3.1.3 beschrieben. Nach Zellzählung (*siehe Kap. 3.2*) wurden die Zellen gemäß des in Kap. 3.4.2 erläuterten Methodenprotokolls behandelt und im FACScan gemessen.

Zur Detektion und FACS- Darstellung der hämatopoetischen Stammzellen/ Vorläuferzellen im KM wurden die Marker CD135, konjugiert mit dem Fluorochrom R-PE, und CD34 FITC verwendet (*Abb. 4.6, A*).

CD135 (*Synonym: Flk-2/ Flt3, Ly-72*) ist ein Rezeptorprotein mit einer intrazellulären Tyrosinkinase- Domäne und spezifisch für hämatopoetischen Stammzellen und unreife Vorläuferzellen des adulten KMs (*Matthews W. et al. 1991*). Zudem wird es von Zellen der fetalen Leber, des fetalen Thymus, der Plazenta und des Hodens exprimiert (*Matthews W. et al. 1991*). Die Funktion des CD135 umfasst die Regulation, Proliferation und Differenzierung der hämatopoetischen Stammzellen, zugleich vermittelt dieser Marker über seinen natürlichen Liganden Flt3 wichtige Reize, die für das Überleben der Zellen wichtig ist (*Lyman S.D. et al. 1993; Hannum C. et al. 1994; Veiby O.P. et al. 1996*).

CD34 ist ein Glykoprotein, welches an der Zelloberfläche unreifer Vorläuferzellen im KM (*Morel F. et al. 1996; Osawa M. et al. 1996*) exprimiert wird und dem Mucosialin der Endothelien der Kapillaren entspricht (*Baumhueter S. et al. 1993*), dessen natürlicher Ligand L-Selektin ist. CD34 erfasst auch die CD135<sup>-</sup> Stammzellen im adulten KM; mit diesem Schema aus 2 Markern war es somit möglich, den Großteil der Stamm- und Vorläuferzellen zu ermitteln. CD135<sup>+</sup> Zellen stellten sich in den Messungen

mit einer relativen Häufigkeit von ca. 1%, CD34<sup>+</sup> Zellen mit ca. 2,6% und CD135<sup>+</sup>-CD34<sup>+</sup> mit ca. 1% in der Fluoreszenz aktivierten Zell Messung dar (Abb. 4.6 **A**; Abb. 4.7). Insgesamt ergibt sich daraus ein Gehalt an hämatopoetischen Vorläuferzellen von ca. 4,6%.

Diese Ergebnisse geben den MW +/- SD von n = 10 Messungen an.

Um die reifen Zellen der großen Gruppe der granulozytären Reihe darstellen zu können (Abb. 4.6, **B**), wählten wir den Ly-6G- Marker (*Synonym*: GR-1), konjugiert mit FITC. Dieser ist ein über einen GPI-Anker mit der Zellmembran verbundenes Protein. Die Expression dieses Markers korreliert direkt mit dem Grad der Differenzierung und der Reifung der Granulozyten im KM, insbesondere mit den Neutrophilen und den Eosinophilen (*Lagasse E. et al. 1996*; *Fleming et al. 1993*).

Dem gegenüber ermittelten wir mit dem Marker TER-119- PE den relativen Gehalt an erythroiden Zellen des KM (Abb. 4.6 **B**). TER-119 (*Synonym*: Ly-76) wird von Zellen der erythroiden Reihe, ausgehend vom Erythroblasten bis zu den reifen Erythrozyten- Stadien im KM, exprimiert (*Ikuta K. et al. 1990*, *Osawa M. et al. 1996*). Jedoch nicht mehr von den gealterten Erythrozyten der Peripherie. Mit diesen beiden für die jeweilige Zellsubpopulation spezifischen Marker, war es möglich, die granulozytäre und die erythroide Zellreihe mit ca. 45% bzw. 25% im KM einer 17 Tage alten Wildtyp- Maus zu detektieren und klar voneinander zu trennen (Abb. 4.6 **B**; Abb. 4.7). (MW +/- SD von n = 10 Messungen)

Zur Untersuchung, in welchem Ausmaß B- und T-Zellen im KM einer 17 Tagen alten Wildtyp- Maus vertreten sind, verwendeten wir CD45R(B220) (Abb. 4.6 **C, D, E, F**) als B-Zell-Marker und CD3e für die Detektion der T-Zellen (Abb. 4.6 **F**). CD45R(B220)-PE bzw. -FITC ist eine Isoform des Glykoproteins CD45, welche in jedem Stadium der B-Zell-Lymphopoese exprimiert wird. Es gehört zur Familie der Protein- Tyrosin- Phosphatasen (PTP) mit einer intrazellulären aus zwei PTP bestehenden katalytischen Domäne und einer glykosylierten extrazellulären Region (*Johnson P. et al. 1997*). Seine Verwendung läßt sich auch als die eines spezifischen Pan-B-Zell-Markers beschreiben, da B220 schon von den frühesten Formen der B-Zelle exprimiert wird (*Coffman R.L. et al. 1982*; *Hardy R.R. et al. 1991*; *Hathcock K.S. et al. 1992*; *Allman D.M. et al. 1992*; *Melchers et al. 1999*).

In geringem Maße wird CD45R auch von cytokin- aktivierten, nicht MHC-beschränkten Killer- Zellen exprimiert, jedoch nicht von Stammzellen und Vertretern der T-Zell-Reihe, erythroiden sowie granulozytären Fraktion (*Johnson P. et al. 1997*).

In unseren Versuchreihen konnten wir B-Zellen im KM mit einer relativen Häufigkeit von ca. 23,8% eruieren (*Abb. 4.6 C, D, E, F; Abb. 4.7*).

Dieses Ergebnis stellt den MW  $\pm$  SD von n = 10 Messungen dar.

CD3e (*Synonym: CD3  $\epsilon$  Kette*), in dieser Arbeit mit FITC konjugiert, zur Ermittlung der T-Zellen- Population im KM ist ein 20 kDa- Transmembran-Polypeptid. Es stellt einen Teil des T-Zell- Rezeptors dar und ist spezifisch für die T-Zell- Reihe (*Miescher G.C. et al. 1989, Leo O. et al. 1987, Allison J.P. 1988*). CD3e ist nicht zur Unterscheidung von unreifen und reifen T-Lymphozyten im Thymus geeignet, da er von beiden Stadien exprimiert wird. Zudem können durch ihn nicht die frühesten Formen des T-Zell-Entwicklungsstadium, bevor diese vom KM in den Thymus wandern, erfasst werden, da diese CD3e<sup>-</sup> sind. Es werden also nur die T-Zellen detektiert, die im Thymus gereift und als reife T-Zelle über das Gefäßsystem in das KM gelangt sind. Der relative Gehalt der T-Zellen im KM konnte in dieser Arbeit mit ca. 6,58% ermittelt werden (*Abb. 4.6 F; Abb. 4.7*).

Diese Angaben spiegeln den MW  $\pm$  SD von n = 10 Messungen wieder.

Die kleine lymphoide Fraktion der NK-Zellen wurde mit dem PAN-NK- Marker (*Synonym: DX5*) detektiert, hier mit FITC verbunden (*Abb. 4.6 E*). Dieser Marker ist für einen Großteil der NK-Zellen und für eine sehr kleine Subpopulation von kleinen T-Zellen spezifisch (*Moore T.A. et al. 1996; Ortaldo J.R. et al. 1998*). In unseren Versuchen stellte sich diese Population der DX5- positiven NK-Zellen mit einer relativen Häufigkeit von ca. 2,74% in der Fluoreszenzmessung dar (*Abb. 4.6 E; Abb. 4.7*).

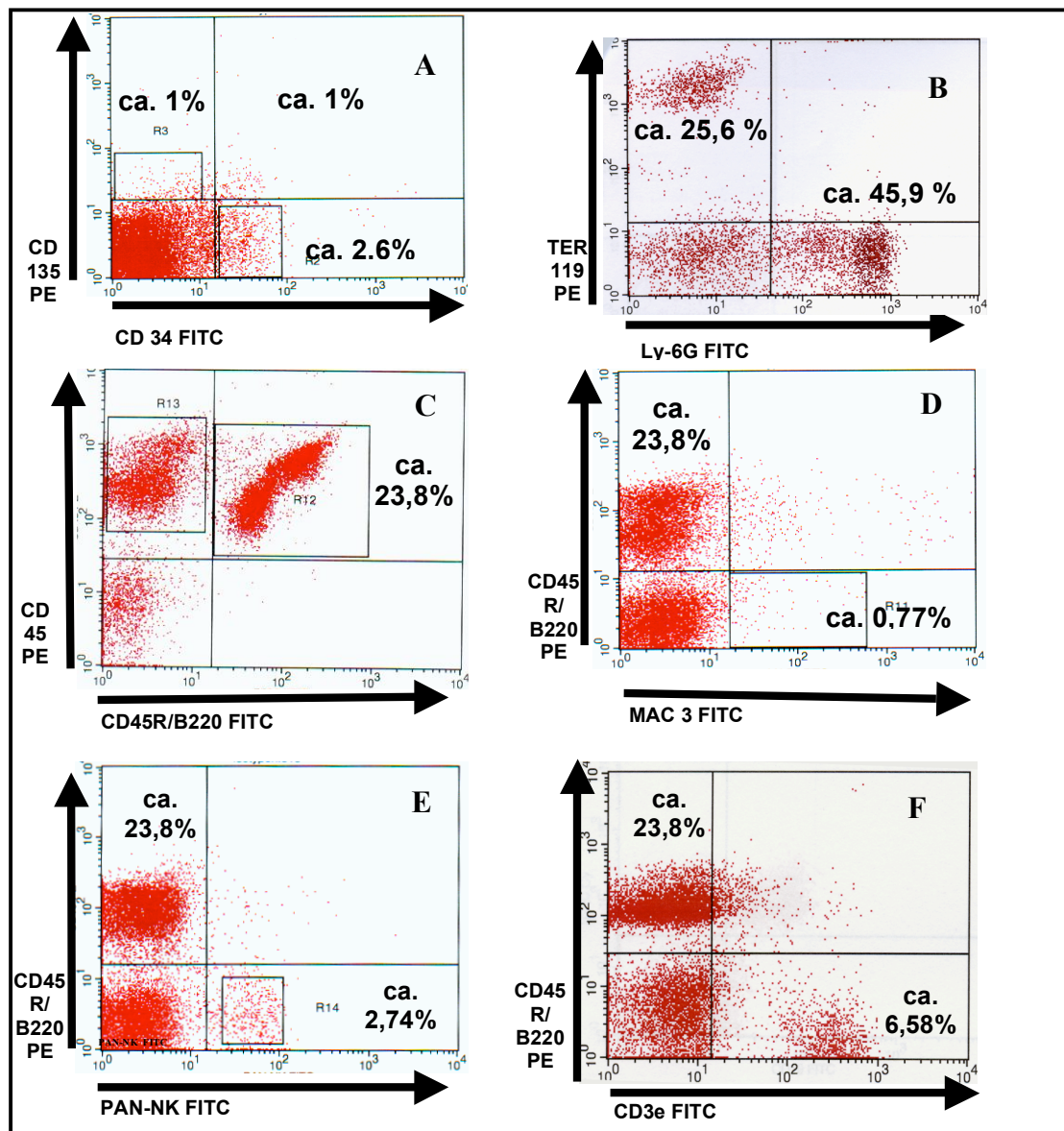
Dieses Ergebnis entspricht dem MW  $\pm$  SD von n = 10 Messungen.

Der Anteil an Makrophagen und Monozyten im KM gingen wir mit dem Antikörper gegen das MAC-3- Antigen nach (*Abb. 4.6 D*). Dieses ist ein 92 – 110 kDa- Transmembran- Glykoprotein und ist ein Entwicklungsmarker für den Großteil der Monozyten-/ Makrophagen- Fraktion. Mit diesem Antikörper konnten wir den Gehalt an Monozyten/ Makrophagen im KM auf ca. 0,77% bestimmen. Setzt man voraus, dass das FACS eine Ungenauigkeit

insbesondere durch unspezifische Lichtstreuung der Fluorochrome bzw. Autofluoreszenz von 0,5 – 1,5% besitzt (*Becton Dickinson Immunocytometry Systems 1998*), so muß man für dieses Ergebnis annehmen, dass wir im KM nur einen verschwindend geringen Anteil von Monozyten/ Makrophagen detektieren konnten.

Dieses Messergebnis stellt den MW  $\pm$  SD von  $n = 10$  Messungen (*Abb. 4.6 D; Abb. 4.7*) dar.

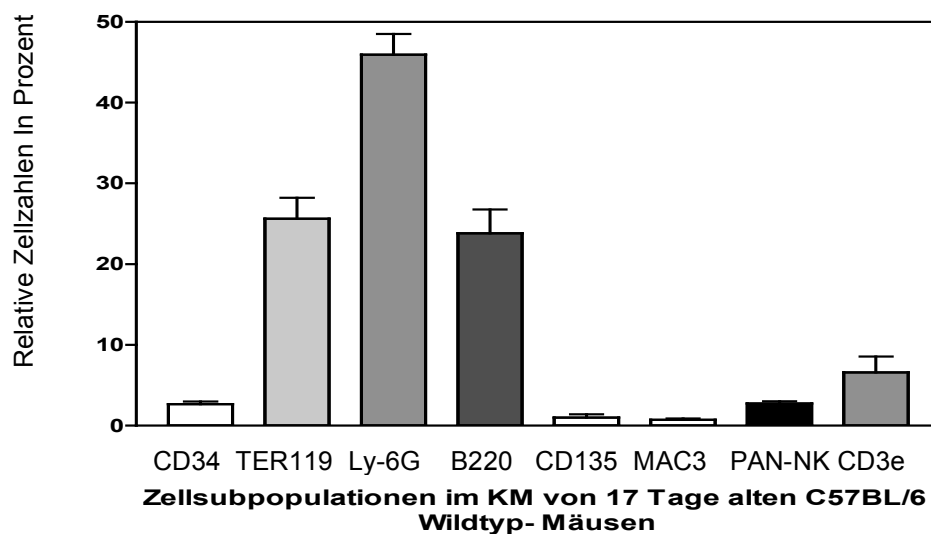




**Abbildung 4.6: Zellverteilung im KM von 17 Tagen alten C57BL/6 Wildtypmäusen im FACS**

Diese FACS- Bilder stellen stellvertretend für  $n = 10$  Messungen die Ergebnisse der Untersuchung der Zellverteilung im KM von 17 Tage alten C57BL/6 Wildtyp- Mäusen dar. Angegeben sind die Messergebnisse in Prozent im MW  $\pm$  SD der einzelnen ermittelten Populationen. **[A]** zeigt mit den Markern CD135-PE und CD34-FITC die relative Häufigkeit von hämatopoetischen Stammzellen auf. Für CD135<sup>+</sup> Zellen konnte nur ein sehr geringer Gehalt von ca. 1%, für CD34<sup>+</sup> Zellen ca. 2,6% und für CD135<sup>+</sup>CD34<sup>+</sup> Zellen ca. 1%. In **[B]** sind die Fluoreszenzereignisse des TER119, Marker für die erythroide Reihe, und Ly-6G, Marker für die granulozytäre Fraktion, aufgezeigt. Dabei stellt sich TER119 mit einer Häufigkeit an Fluoreszenzsignalen von ca. 25,6% und Ly-6G von ca. 45,9% dar. In **[C]** ist der Pan-Leukozytenmarker CD45 gegen seinen Isotyp, den Pan- B- Zell- Marker CD45R(B220) aufgetragen. Die B- Zellen werden mit einer Häufigkeit von ca. 23,8% angegeben. **[D], [E], [F]** zeigen die Fluoreszenzereignisse des Pan- B- Zell- Markers CD45R(B220) gegenüber den Markern für die reifen T-Zellen CD3e-FITC mit ca. 6,58%, den Natürlichen Killer- Zellen PAN-NK-FITC mit ca. 2,74% und dem Marker für die Monozyten-Makrophagen- Fraktion MAC3-FITC mit ca. 0,77%. Bei einer Autofluoreszenz von ca. 0,5 – 1,5% ist ein solches Ergebnis für die Population der Monozyten und Makrophagen im KM nicht zu verwerten. Ihren Gehalt konnten wir mit unserem Marker- Schema entweder nicht detektieren und bestimmen oder aber sie sind im KM eines 17 Tage alten C57BL/6- Maus in einem zu geringem Umfang vorhanden.

Alle Werte spiegeln den ermittelten MW  $\pm$  SD von  $n = 10$  Messungen wieder.



**Abbildung 4.7: Zellsubpopulationen im KM von 17 Tagen alten C57BL/6 Wildtypmäusen**

Aufgetragen sind in diesem Balkendiagramm die Werte aus  $n = 10$  Messungen mit den Standardabweichungen für die jeweiligen Marker, die spezifisch für die Detektion der Population im KM verwendet wurden. Hierbei zeigt sich, dass die drei größten Fraktionen im KM einer Wildtypmaus die der erythroiden (25,6%), der granulozytären (45,9%) und der B-lymphoiden (23,8%) Reihe sind. Der Anteil der Stammzellen und der Makrophagen/Monozyten ist sehr gering. Gerade über CD135 (1%) und MAC3 (0,77%) können wir keine genaue Aussage machen, da unter Berücksichtigung der Autofluoreszenz von ca. 0,5 – 1,5% (*Becton Dickinson Immunocytometry Systems 1998*) die FACS- Analyse Häufigkeiten von Fluoreszenzereignissen erbracht hat, die sich in diesem Bereich der Autofluoreszenz bewegt.

Dargestellt sind MW  $\pm$  SD von  $n = 10$  Messungen

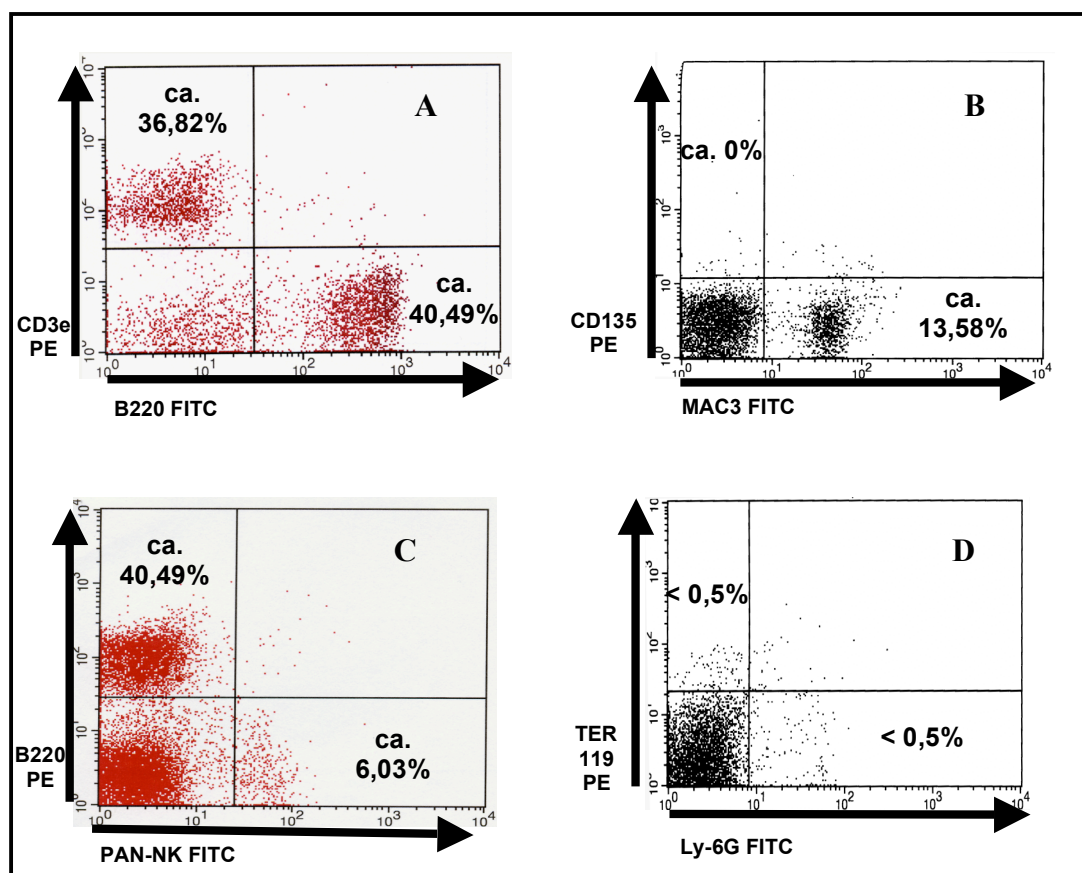
#### 4.1.3.2 Zellverteilung in der Milz

Wir stellten uns die Frage, welche Zell- Populationen und in welcher Häufigkeit diese in der Milz im Gegensatz zum KM vertreten sind. Um diese verschiedenen Zelltypen in der Milz einer 17 Tage alten C57BL/6 Wildtypmaus darzustellen, verwendeten wir dieselben Fluoreszenzmarker wie schon zuvor für die Untersuchung des KMs. Präparation, Zellzählung und Aufbereitung der Zellen für die FACS- Messung erfolgten wie schon zuvor beim KM nach standardisierten Protokollen (*siehe Kap. 3.1.3, 3.2, 3.4.2*).

In den Untersuchungen zeigten sich folgende Ergebnisse:

CD135 (*Abb. 4.8 B*), CD34 sowie TER119 und Ly-6G (*Abb. 4.8 D*) konnten nicht bzw. nur unzureichend im FACS dargestellt werden. Die ermittelten Häufigkeiten lagen in den Messungen nur geringfügig über 0%. Trotz der guten Durchblutung der Milz konnte der Marker TER119 für die Zellen der

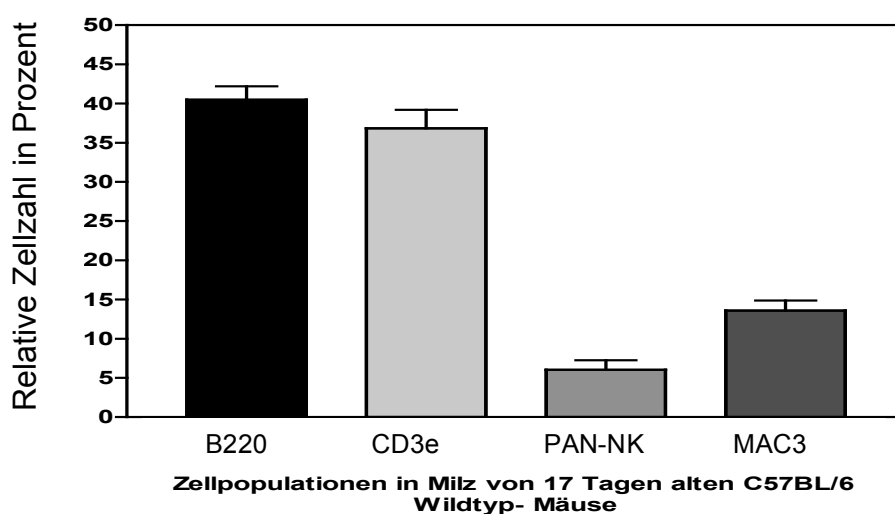
erythroiden Reihe nicht detektiert werden. Dies liegt daran, dass Erythrozyten nach Ausschwemmen aus dem KM mit zunehmendem Alter dieses Antigen nicht mehr exprimieren. Die B-Zellen, mit dem Pan- B- Zell-Marker CD45R(B220) nachgewiesen, stellten sich mit einer relativen Häufigkeit von ca. 40,49% dar (Abb. 4.8 A, C). Mittels CD3e konnten wir den relativen Gehalt an T-Zellen in der Milz auf ca. 36,82% ermitteln (Abb. 4.8 A). Der Anteil der Monozyten/ Makrophagen mit MAC 3 sowie der Natürlichen Killer- Zellen mit PAN-NK- Marker wurde mit ca. 13,58% bzw. 6,03% bestimmt (Abb. 4.8 B, C). Alle Angaben stellen einen MW +/- SD von n = 10 Messungen dar.



**Abbildung 4.8: Zellverteilung in der Milz von 17 Tage alten C57BL/6 Mäuse im FACS**

Diese Abbildungen zeigen repräsentativ n = 10 FACS- Messungen einer Nativzell- Lösung aus der Milz einer 17 Tage alten C57BL/6 Wildtypmaus. In [A] sind die Marker CD45R(B220) für die B-Zellen und CD3e für den Nachweis von reifen T-Zellen gegeneinander aufgetragen. In den Untersuchungen zeigten sich die B-Lymphozyten mit einer relativen Häufigkeit von ca. 40,49% und die T-Lymphozyten mit ca. 36,82%. Stammzellen, sowie Vertreter der erythroiden und granulozytären Reihe konnten nicht oder nur ungenügend im FACS dargestellt werden [B]; [D]. Die Monozyten/ Makrophagen-Fraktion sowie die Natürlichen Killer-Zellen wurden in den Messungen mit einem relativen Gehalt von 13,58% bzw. 6,03% ermittelt [B]; [C]. Der Anteil der Lymphozyten und der Makrophagen ist im Gegensatz zum KM wesentlich höher. Während dessen Granulozyten und TER119 tragende Erythrozyten in der Milz im Vergleich zum KM kaum vertreten sind. Alle hier angegebenen Ergebnisse der relativen Fluoreszenzereignisse im FACS entsprechen dem MW +/- SD von n = 10 Messungen.

In der Milz sind demnach die lymphoiden Zellen sowie die Monozyten/ Makrophagen im höheren Ausmaß vertreten als im KM. Zudem ist das zelluläre Milieu im Vergleich zum KM dahingehend verändert, dass Stammzellen/ Vorläuferzellen in der Milz fehlen. In dieser konnte demnach in diesen Messungen ein Umfeld aus reifen Zellen ermittelt werden, während im KM unreife, heranreifende und reife Zellen vorhanden sind. Die weitere molekularbiologische Betrachtung der Expression von NT und NT-Rezeptoren soll klären, ob sich zu der Veränderung des zellulären Umfeldes auch das Expressionsmuster der NT/ NT- Rezeptoren der B-Zellen ändert.



**Abbildung 4.9: Zellsubpopulationen in der Milz von 17 Tagen alten C57BL/6 Wildtypmäusen**

In diesem Diagramm sind die detektierbaren Zellpopulationen der Milz eines 17 Tage alten C57BL/6 Versuchstieres dargestellt. Die Fraktion der Stammzellen (CD135 und CD34), die erythroiden und granulozytären Zellen konnten in den FACS- Messungen nicht oder nur unzureichend dargestellt werden. Das zelluläre Milieu in der Milz ist dominiert durch die lymphoiden Zellen (B-Zellen mit ca. 40,49%, T-Lymphozyten mit 36,82%; NK-Zellen mit ca. 6,03%). Ein großer Anteil mit ca. 13,58% nehmen die Monozyten/ Makrophagen in der Milz ein.

Alle diese Angaben entsprechen dem MW +/- SD von n = 10 Messungen aus einer Nativ-Zell- Lösung und nach standardisiertem Protokoll behandelt.

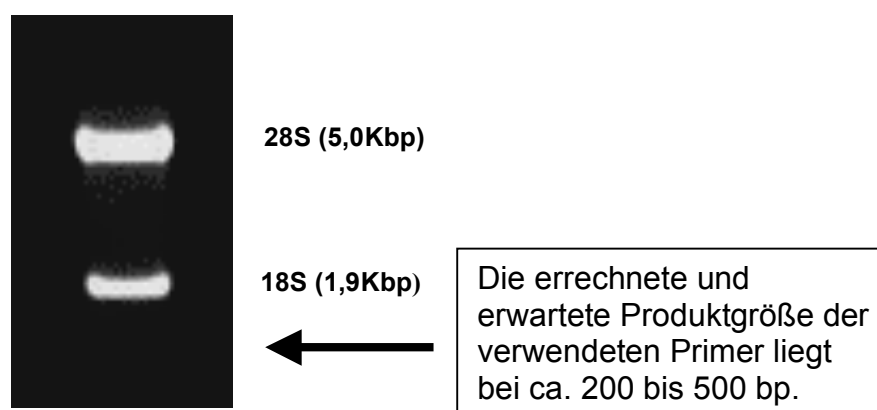
## 4.2 Qualitative PCR

### 4.2.1 Ergebnisse der molekularbiologischen Methodenetablierung

Wie im *Kapitel 3.5.1* beschrieben wurden standardmäßig  $1 \times 10^7$  Zellen aus Milz und KM, die vorher nach CD45R(B220) mittels MACS aufgereinigt worden sind, und Gehirn für die molekularbiologische Untersuchung der

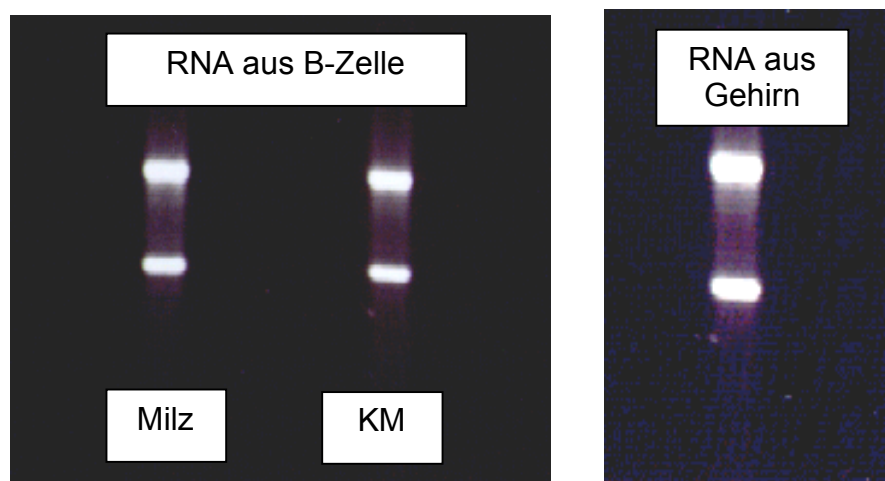
Expression der NTs und NT-Rezeptoren verwendet. Die Zellen aus dem Gehirn der C57BL/6 Wildtypmäuse wurden speziell für die Etablierung und Standardisierung der molekulargenetischen Methodik hinzu gezogen, da die Nerven- und Gliazellen alle bekannten NT sowie deren Rezeptoren in ausreichendem, molekular detektierbaren Maße exprimieren (*Heumann et al. 1994; Kaplan et al. 1994*).

Die Methodik der RNA- Extraktion (*siehe Kap. 3.5.1*) wurde mittels zweier Verfahren auf ihren Erfolg hin überprüft. Zum einen mit dem Gene Quant II RNA-/ DNA- Kalkulator, einem Photometer, mit dem es möglich ist, den Gesamt- RNA- Gehalt einer Probe in  $\mu\text{g}$  pro  $\mu\text{l}$  zu ermitteln. Zum anderen mit der klassischen RNA- Agarosegelelektrophorese (*Abb. 4.10*), die sich dadurch auszeichnet, dass sie wesentlich empfindlicher in der Detektion von RNA ist. In dieser Gelelektrophorese müssen sich bei erfolgreicher Gesamt- RNA- Extraktion zwei Banden der ribosomalen RNA zeigen. Nach ihrem Dichteverhalten werden sie in eine 28S- und 18S- Einheit unterteilt. Aufgrund ihres geringen Gehaltes in einer tierischen Zellen zeigt sich für die mRNA keine Bande in der Elektrophorese. Der Nachweis der Banden ribosomaler RNA gilt daher als ein Zeichen für die erfolgreiche Extraktion der Gesamt- RNA aus den B-Zellen der Milz und des KM sowie der Zellen aus dem Gehirn (*Abb. 4.11*).



**Abbildung 4.10: RNA- Auftrennung in der Agarosegelelektrophorese**

Nach erfolgreicher RNA- Extraktion der Gesamt- RNA aus tierischen Zellen (hier: Gehirn) müssen sich in dieser Kontrolle 2 charakteristische Banden der ribosomalen RNA (rRNA) zeigen. Die Messenger- RNA (mRNA) zeigt aufgrund ihres Gehaltes (1 – 2% der Gesamt- RNA) und ihrer Größe in einer Zelle keine charakteristische Bande. Die errechnete Produktgröße der Primer (*Metabion GmbH; Tab. 4.2*) liegt bei ca. 200 – 500 bp.



**Abbildung 4.11: Ergebnis der RNA- Extraktion aus den B-Zellen von Milz und KM und den Zellen des Gehirns von C57BL/6**

Nach der Etablierung und Standardisierung der RNA- Extraktionsmethodik (siehe Kap. 3.5.1) zeigten sich für alle in dieser Arbeit verwendeten Zellen die klassischen zwei Banden der ribosomalen RNA. Diese Proben konnten für die weitere molekularbiologische Untersuchung verwendet werden.

Mittels des Gene Quant II- RNA/ DNA- Kalkulators konnte der Gesamt- RNA- Gehalt einer Probe, die in der RNA- Agarosegelelektrophorese eine 28S- und 18S- Bande zeigte, bestimmt werden, so dass für den weitergehenden Arbeitsschritt der Transkription der gewonnenen RNA in DNA standardmäßig 0,25 – 0,3 µg RNA (*Invitrogene Life Technologies 1999*) verwendet werden konnten. In Kap. 3.5.2 ist die Grundlage und die Methodik der Transkription aufgezeigt.

Die Etablierung der PCR- Bedingungen mit den NT- und NT- Rezeptoren- Primern erfolgte mit der mRNA aus dem Gehirn der Versuchstiere. Die entstandenen Produkte wurden anhand ihrer Größe (bp) im Agarosegel überprüft und ausgewertet (*Abb. 4.12 und Tab. 4.2*) und mit den errechneten Produktgrößen (*Metabion GmbH 2002; Tab. 4.2*) verglichen.

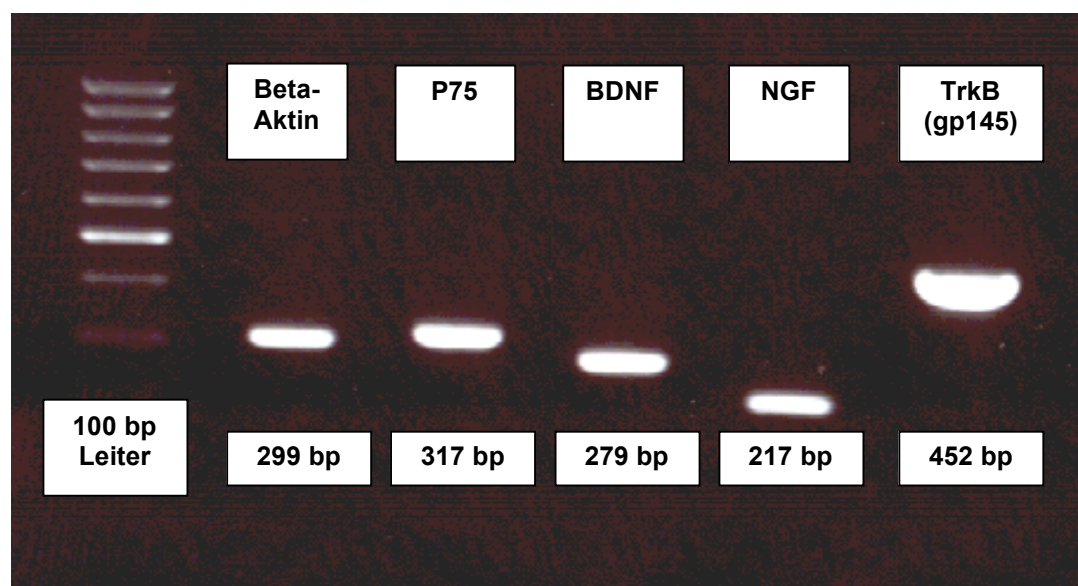
Ziel dieser Etablierung mit cDNA aus dem Gehirn war es, die geeigneten PCR- Bedingungen zu wählen, mit der die Vielzahl der in dieser Arbeit verwendeten Primer ein klares PCR- Produkt im Agarosegel ergeben. Die Zahl der Primer- Dimere sollte auf ein Minimum reduziert sein. Die Bedingungen und die Durchführung der qualitativen PCR, wie sie mit diesen Versuchen etabliert und standardisiert wurden, sind im Kap. 3.5.3 (siehe Tab. 3.4 und Tab. 3.5) dargelegt.



Primer	Forward(FW)/ Reverse (RV)	Sequenz (5'-3')	Produktgröße
Beta-Aktin	FW	CCA ACC GTG AAA AGA TGA CC	299 bp
	RV	TTT GAT GTC ACG CAC GAT TT	
GABDH	FW	ACC CAG AAG ACT GTG GAT GG	300 bp
	RV	GGA GAC AAC CTG GTC CTC AG	
trkA	FW	CGT AGT CCC AGC CAG TGT GC	320 bp
	RV	TCA GGG TTG AAC TCA AAA GG	
trkB (gp95)	FW	TGC ACA CTA AAA GTC TAA TCC ACA	399 bp
	RV	TGG ACT TTG AAA GCA ATC GTT	
trkB (gp145)	FW	AAA TCG CAG CAG GTA TGG TC	452 bp
	RV	GTT CTG AAG GAG GGT GTG GA	
trkC	FW	ACC TGA CTG TCC GAG AAG GA	420 bp
	RV	CCT CCC CCT CCT GGT AGT AG	
p75	FW	CCA GAG CGA GAC CTC ATA GC	317 bp
	RV	GCA GTC TGT GTG TGG GTC TG	
NGF	FW	GTG TCA GTG TGT GGG TTG GA	217 bp
	RV	GCC TTG ACG AAG GTG TGA GT	
BDNF	FW	AGG ACG CGG ACT TGT ACA CT	279 bp
	RV	TCA GTT GGC CTT TGG ATA CC	
NT3	FW	CTG AGT GAC AGC ACC CCT TT	216 bp
	RV	CAG CAC TGT GAC CTG GTG TC	

**Tabelle 4.2: Primer der qualitativen PCR und deren errechnete Produktgröße**

Diese Angaben stammen von der Metabion GmbH, 82152 Germany.



**Abbildung 4.12: Etablierung der PCR- Standard - Bedingungen mit cDNA aus Gehirn**

Diese Abbildung repräsentiert die erfolgreiche Etablierung der PCR- Bedingungen für mehrere in dieser Arbeit verwendete Primer. Ziel diese Etablierung war es, für die Vielzahl der unterschiedlichen Primer der NTs und NT- Rezeptoren die PCR- Bedingung zu finden, mit der alle diese Primer ein klares PCR- Produkt ergeben. Anhand der errechneten Produktgröße für die einzelnen Primer läßt sich die Qualität der PCR bewerten. Die 100 bp- Leiter, die parallel zu den Produkten im Agarosegel aufgetragen ist, beinhaltet Gemische spezifischer DNA- Fragmente. Somit ist eine Kontrolle der in der PCR entstandenen Produkte möglich. Als interne Kontrolle wurde in dieser PCR Beta-Aktin verwendet. Aufgetragen wurden zwei NT- Rezeptoren, der Pan- NT- Rezeptor p75 und TrkB(gp145), und zwei NTs, BDNF und NGF. Die mit diesem Versuch etablierten Bedingungen der PCR und des PCR- Reaktionsansatzes sind im Kap. 3.5.3.2 (Tab. 3.4 und 3.5) dargelegt. Die Bedingungen der Agarosegelelektrophorese waren U = 100 V, I = 150 mA und P = 50 W bei einer Laufzeit von 1,5 Std.

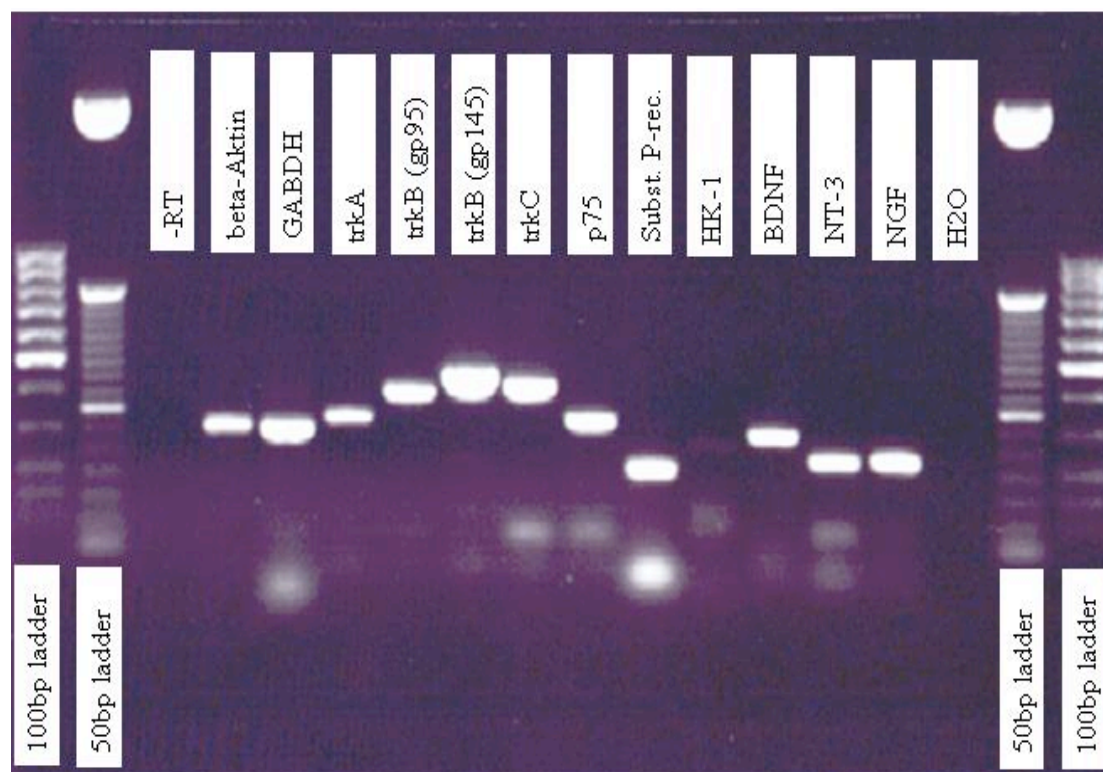
#### 4.2.2 NT- und NT- Rezeptor- Expression im Gehirn als Standard und Kontrolle

Die Etablierung und Austestung der PCR- Bedingungen mit den Nerven- und Gliazellen der Maus ergab, dass das Gehirn die mRNA für alle in dieser Arbeit verwendete NTs und NT- Rezeptoren in ausreichendem, detektierbaren Maße enthielt (*Abb. 4.13*) (*Heumann et al. 1994; Kaplan et al. 1994*). Die Produkte der PCR- Reaktionen mit den Primern der NT- Rezeptoren trkA (320 bp), trkB (gp95) (399bp), trkB (gp145) (452 bp), trkC (420 bp), p75 (317 bp) und der NT- Liganden BDNF (279 bp), NT-3 (216 bp) und NGF (217 bp) zeigen die erwartete Produktgröße, die für die verwendeten Primer errechnet wurde (*Metabion GmbH 2002; errechnete Größen sind in Klammern angegeben*). Beta-Aktin und GAPDH fungieren als interne Kontrolle der PCR, die sich in den einzelnen Reaktionen bei einer Produktgröße von 299 bp bzw. 300 bp reproduzieren (*Abb. 4.13*). Die parallel zu den einzelnen Reaktionsgemischen verlaufende Non-Rev.-T.-Kontrolle (-RT) und H<sub>2</sub>O- Probe zeigen keine Verunreinigung der Reaktionsgemische mit Fremd- DNA auf.

Zum einen ließ mit dieser Versuchsanordnung der Nachweis der NT- Rezeptoren und NTs im Gehirn von C57BL/6 aus vergangenen Experimenten reproduzieren, zum anderen konnten Standards hinsichtlich der Bedingungen für die PCR etabliert werden, so dass die Ergebnisse der Expression für Gehirn, Milz und KM vergleichbar gemacht werden konnten. Eine semiquantitative Auswertung der entstandenen Produkte in der qualitativen PCR mittels der Analysesoftware GelScan V5.01, welche die Fluoreszenzintensität des in die DNA- Stränge eingelagerten Ethidiumbromids in Abhängigkeit der Menge der PCR- Produkte im Agarosegel vergleicht, ist in dieser Versuchsanordnung nicht möglich und sinnvoll, da die qualitativen PCR- Experimente dieser Arbeit mit der maximal zulässigen Zykluszahl von 42 Zyklen durchgeführt wurden (*siehe Kap. 3.5.3.2 und Tab. 3.5*) und die entstandenen Produkte sich, in Abhängigkeit der verwendeten Primer, in unterschiedlicher Größe replizierten. Eine eindeutige Differenzierung der Fluoreszenzsignalstärke der verschiedenen PCR- Produkte erbringt somit keine verwertbaren Ergebnisse. Die



quantitative Analyse der Expression der NT- Rezeptoren und NTs erfolgt in dieser Arbeit mittels LightCycler® (siehe Kap. 4.3). Dieses System ermöglicht unabhängig der Ethidiumbromid- Fluoreszenz einen Vergleich der Menge der entstandenen Produkte.



**Abbildung 4.13: PCR der Primer aller NTs und NT- Rezeptoren aus dem Gehirn von C57BL/6**

Das abgebildete Agarosegel zeigt, dass die Zellen des Gehirns aus C57BL/6- Wildtypmaus alle in dieser Arbeit zur Untersuchung stehenden NT- Rezeptoren und NT- Liganden exprimiert bzw. synthetisiert (Heumann et al. 1994; Kaplan et al. 1994). Aufgetragen auf das Agarosegel sind die Produkte der PCR- Reaktionen mit den Primern der NT- Rezeptoren **trkA (320 bp)**, **trkB (gp95) (399bp)**, **trkB (gp145) (452 bp)**, **trkC (420 bp)**, **p75 (317 bp)** und der NT- Liganden **BDNF (279 bp)**, **NT-3 (216 bp)** und **NGF (217 bp)**. **Beta-Aktin** und **GAPDH** als interne Kontrolle der PCR ergeben in der PCR- Reaktion Produkte in den erwartenden Größen von **299 bp** bzw. **300 bp**. Die parallel zu den einzelnen Reaktionsgemischen verlaufende Non- Rev.- T.- Kontrolle (-RT) und H<sub>2</sub>O- Probe zeigen keine Verunreinigung der Reaktionsgemische mit Fremd- DNA auf. Mittels der Reaktionsgemische parallel verlaufenden DNA- Leitern, die DNA- Fragmente spezifischer Größe beinhalten, ist eine Ermittlung der Größe der entstandenen Produkte in bp möglich. Es zeigen sich die erwarteten Produktgrößen, welche mit den errechneten Größen – in Klammern angegeben - übereinstimmen (Metabion GmbH 2002), für die einzelnen in den Reaktionen verwendeten Primer (siehe Tab. 4.2). Die Bedingungen der PCR und des PCR- Reaktionsansatzes sind im Kap. 3.5.3.2 (Tab. 3.4 und 3.5) dargelegt. Die in diesem Gel aufgetragenen Produkte des Substanz-P- Rezeptors und seines natürlichen Liganden Hämokinin-1 (HK-1) zeigten in den einzelnen Reaktionen unterschiedliche Produktgrößen; ein stabiles Reaktionsprodukt ließ sich nicht eruieren, so dass keine Aussage über Substanz-P- Rez. und HK-1 in dieser Arbeit getroffen werden kann.

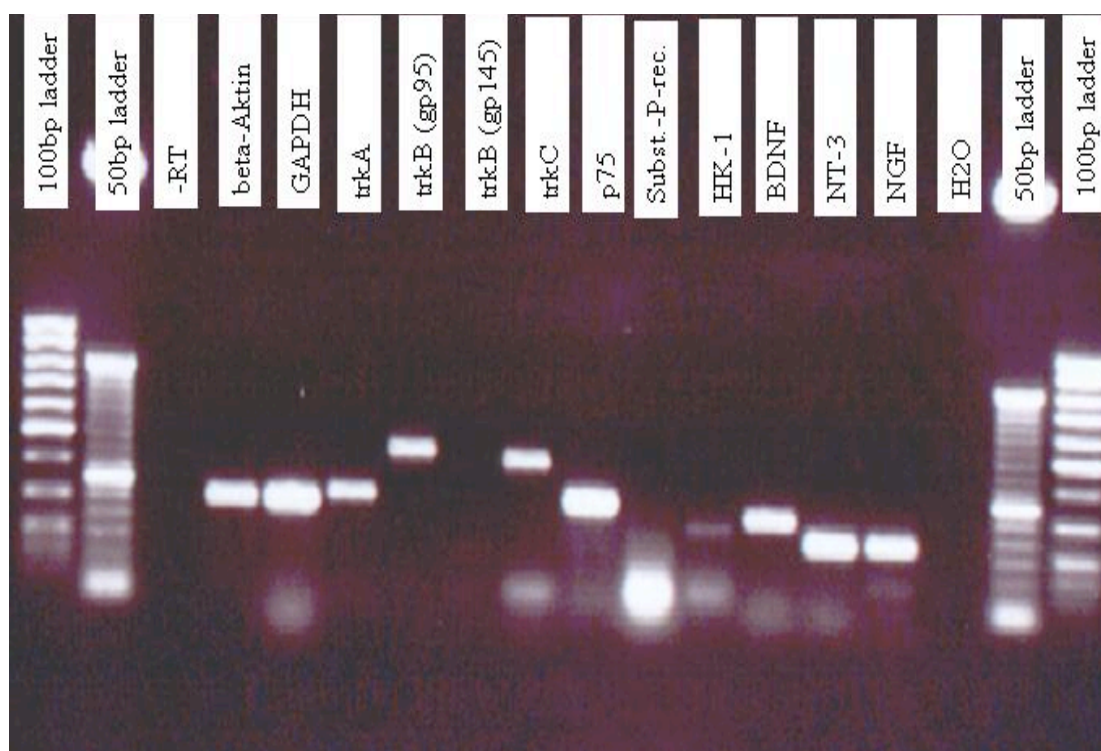
Die Bedingungen der Agarosegelelektrophorese waren U = 100 V, I = 150 mA und P = 50 W bei einer Laufzeit von 1,5 Std.

#### 4.2.3 NT- und NT- Rezeptor- Expression auf B220 positiven B-Zellen im KM

Wir stellten uns die Frage, welche NT- Rezeptoren und welche NTs von CD45R positiven B- Zellen im KM exprimiert bzw. synthetisiert werden. Dazu extrahierten wir RNA aus mittels MACS nach CD45R(B220) aufgereinigten B-Zellen des KM und schrieben diese in cDNA gemäß Kapitel 3.5.2 um. Die Bedingungen der qualitativen PCR, welche für die verwendeten Primer mit Zellen des Gehirns von 17 Tagen alten C57BL/6 Wildtypmäusen standardisiert wurden (Kap. 4.2.2), sind im Kapitel Kap. 3.5.3.2 (Tab. 3.4 und 3.5) dargestellt.

Es konnte gezeigt werden, dass in den B-Zellen im KM der verwendeten Versuchstiere die mRNA aller NT- Rezeptoren und NTs vorhanden ist (Abb. 4.14), außer der mRNA des trkB (gp 145) (siehe Kap. 4.2.5). Das abgebildete Agarosegel (Abb. 4.14) zeigt die Produkte der PCR- Reaktionen – errechnete Produktgrößen in Klammern angegeben - mit den Primern der NT- Rezeptoren trkA (320 bp), trkB (gp95) (399bp), trkC (420 bp), p75 (317 bp) und der NT- Liganden BDNF (279 bp), NT-3 (216 bp) und NGF (217 bp) nach einer Laufzeit im elektromagnetischen Feld von 1,5 Std. bei  $U = 100 \text{ V}$ ,  $I = 150 \text{ mA}$  und  $P = 50 \text{ W}$ . Beta-Aktin und GAPDH als interne Kontrolle der PCR- Reaktion lassen sich entsprechend der für dieses Experiment verwendeten Primer bei 299bp bzw. 300bp reproduzieren. Eine Verunreinigung mit Fremd- DNA der PCR- Proben lässt sich durch die parallel zu den einzelnen Reaktionsgemischen verlaufende Non- Rev.- T.- Kontrolle (-RT) und H<sub>2</sub>O- Probe ausschließen. Die dem Gel aufgetragene DNA-Leitern, bestehend aus 100bp- und 50bp- Fragmenten, lassen eine Bestimmung der Größe in bp der entstandenen PCR- Produkten zu. Diese aus dem Gel ermittelten und reproduzierbaren Größen entsprechen der in Klammern angegebenen errechneten Größen (Metabion GmbH 2002). Der NT- Rezeptor trkB (gp 145) ließ sich in wiederholt durchgeführten Experimenten nicht darstellen. Eine genauere molekularbiologische Untersuchung der Expression des trkB (gp 145) auf CD45R(B220) positiven

B-Zellen aus dem KM der verwendeten Versuchstiere ist im Kap. 4.2.5 wiedergegeben.



**Abbildung 4.14: PCR der Primer aller NTs und NT- Rezeptoren aus KM von C57BL/6**

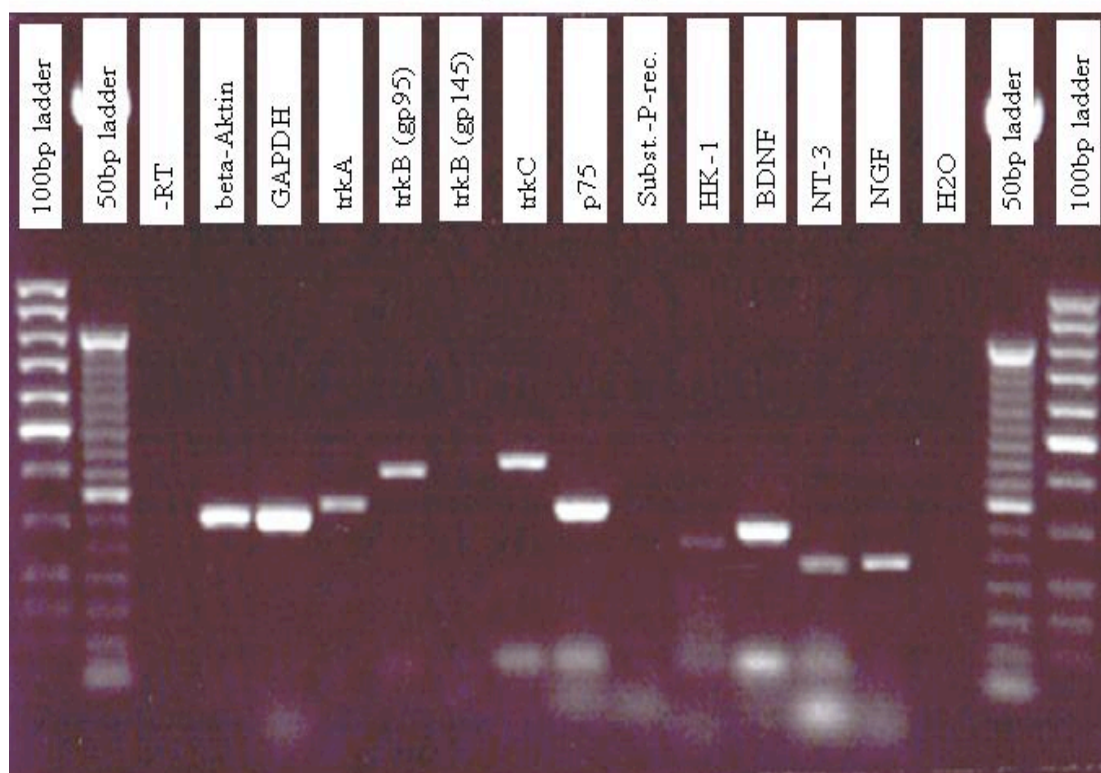
Diese repräsentative Abbildung eines Agarosegels mit den Produkten der qualitativen PCR der cDNA, extrahiert aus CD45R(B220) positiven B-Zellen des KMs, zeigt, dass die B-Lymphozyten des KMs aus 17 Tagen alten C57BL/6- Wildtypmäusen alle in dieser Arbeit zur Untersuchung stehenden NT- Rezeptoren und NT- Liganden exprimiert bzw. synthetisiert mit Ausnahme des trkB (gp 145). Dieser ließ sich nicht in den B-Zellen des KMs nachweisen. Aufgetragen auf das Agarosegel sind die Produkte der PCR- Reaktionen mit den Primern der NT- Rezeptoren **trkA (320 bp)**, **trkB (gp95) (399bp)**, **trkC (420 bp)**, **p75 (317 bp)** und der NT- Liganden **BDNF (279 bp)**, **NT-3 (216 bp)** und **NGF (217 bp)**. **Beta-Aktin** und **GAPDH** als interne Kontrolle der PCR ergeben in der PCR- Reaktion Produkte in den erwartenden Größen von **299 bp** bzw. **300 bp**. Die parallel zu den einzelnen Reaktionsgemischen verlaufende Non- Rev.- T.- Kontrolle (-RT) und H<sub>2</sub>O- Probe zeigen keine Verunreinigung der Reaktionsgemische mit Fremd- DNA auf. Mittels der Reaktionsgemische parallel verlaufenden DNA- Leitern, die DNA- Fragmente spezifischer Größe beinhalten, ist eine Ermittlung der Größe der entstandenen Produkte in bp möglich. Es zeigen sich die erwarteten Produktgrößen für die einzelnen in den Reaktionen verwendeten Primer (*siehe Tab. 4.2*), die mit den errechneten Größen – in Klammern angegeben - übereinstimmen (*Metabion GmbH 2002*). Die Bedingungen der PCR und des PCR- Reaktionsansatzes sind im Kap. 3.5.3.2 (*Tab. 3.4 und 3.5*) dargelegt und entsprechen der etablierten Standardbedingungen, die mit den Zellen des Gehirns eruiert wurden. Die in diesem Gel aufgetragenen Produkte des Substanz-P- Rezeptors und seines natürlichen Liganden Hämokinin-1 (HK-1) zeigten in den einzelnen Reaktionen unterschiedliche Produktgrößen; ein stabiles Reaktionsprodukt ließ sich nicht eruieren, so dass keine Aussage über Substanz-P- Rez. und HK-1 in dieser Arbeit getroffen werden kann. Die Bedingungen der Agarosegelelektrophorese waren U = 100 V, I = 150 mA und P = 50 W bei einer Laufzeit von 1,5 Std.

#### 4.2.4 NT- und NT- Rezeptor- Expression auf B220 positiven B-Zellen in der Milz

Die folgende molekularbiologische Untersuchung soll klären, ob die mittels MACS nach CD45R(B220) gewonnenen B-Zellen aus der Milz sich hinsichtlich der Expression und Synthese der NT- Rezeptoren und NTs von den aus dem KM extrahierten B-Zellen unterscheiden. Die unter standardisierten Bedingungen durchgeführten Experimente zeigen **keinen qualitativen** Unterschied hinsichtlich des Vorhandenseins von mRNA von NT- Rezeptoren und NTs in B-Zellen der Milz und des KMs. Auch die B-Zellen der Milz enthalten die mRNA aller in dieser Arbeit verwendeten NT- Rezeptoren und NTs (*Abb. 4.15*), abgesehen des trkB(gp 145)- Rezeptors, der sich in wiederholt durchgeführten molekularbiologischen Versuchen nicht darstellen läßt (*Kap. 4.2.5*). Eine quantitative Analyse mit dem LightCycler®- System soll nun klären, ob sich die B-Zellen des KMs und der Milz hinsichtlich des mRNA- Gehaltes für die NT- Rezeptoren und der NTs unterscheiden (*siehe Kap. 4.3*).

Das an dieser Stelle abgebildete Agarosegel (*Abb. 4.15*) mit einer Laufzeit von 1,5 Std. ( $U = 100 \text{ V}$ ,  $I = 150 \text{ mA}$  und  $P = 50 \text{ W}$ ) zeigt, dass die entstandenen Produktgrößen, gemessen an den parallel verlaufenden DNA-Leitern mit 50 bp- und 100 bp- Fragmenten, den Größen entsprechen, die für die verwendeten Primer in dieser Arbeit errechnet worden waren (*Metabion GmbH 2002*). Damit konnte sich dasselbe Ergebnis erzielen lassen, welches sich auch mit den B-Zellen aus dem KM zeigte.

Aufgetragen auf das Agarosegel sind die Produkte – errechnete Größen in Klammern angegeben - der PCR- Reaktionen mit den Primern der NT- Rezeptoren trkA (320 bp), trkB (gp95) (399bp), trkC (420 bp), p75 (317 bp) und der NT- Liganden BDNF (279 bp), NT-3 (216 bp) und NGF (217 bp). Die interne Kontrolle der PCR mittels Beta-Aktin und GAPDH ergeben in der PCR- Reaktion Produkte in den erwartenden Größen von 299 bp bzw. 300 bp. Die parallel zu den einzelnen Reaktionsgemischen verlaufende Non-Rev.- T.- Kontrolle (-RT) und H<sub>2</sub>O- Probe zeigen keine Verunreinigung der Reaktionsgemische mit Fremd- DNA auf.



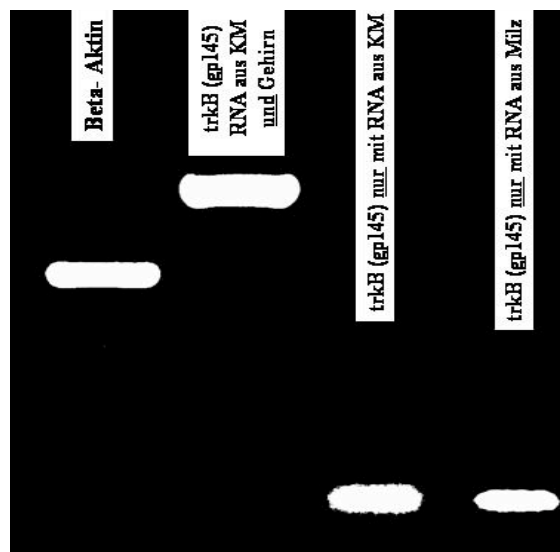
**Abbildung 4.15: PCR der Primer aller NTs und NT- Rezeptoren aus der Milz von C57BL/6**

Das abgebildete Agarosegel der PCR- Produkte der cDNA aus CD45R(B220) positiven B-Zellen der Milz von 17 Tage alten C57BL/6- Wildtypmäusen zeigt, dass diese Zellen alle in dieser Arbeit zur Untersuchung stehenden NT- Rezeptoren und NT- Liganden exprimiert bzw. synthetisiert außer des trkB (gp 145) NT- Rezeptors. Aufgetragen auf das Agarosegel sind die Produkte der PCR- Reaktionen mit den Primern der NT- Rezeptoren **trkA (320 bp)**, **trkB (gp95) (399bp)**, **trkC (420 bp)**, **p75 (317 bp)** und der NT- Liganden **BDNF (279 bp)**, **NT-3 (216 bp)** und **NGF (217 bp)**. **Beta-Aktin** und **GAPDH** als interne Kontrolle der PCR ergeben in der PCR- Reaktion Produkte in den erwartenden Größen von **299 bp** bzw. **300 bp**. Die parallel zu den einzelnen Reaktionsgemischen verlaufende Non- Rev.- T.- Kontrolle (-RT) und H<sub>2</sub>O- Probe zeigen keine Verunreinigung der Reaktionsgemische mit Fremd- DNA auf. Mittels den entstandenen PCR- Produkten parallel verlaufenden DNA- Leitern, die DNA-Fragmente spezifischer Größe beinhalten, ist eine Ermittlung der Größe der entstandenen Produkte in bp möglich. Es zeigen sich die erwarteten Produktgrößen für die einzelnen in den Reaktionen verwendeten Primer (siehe Tab. 4.2), die den errechneten Größen entsprechen (Metabion GmbH 2002). Die standardisierten Bedingungen der PCR und des PCR- Reaktionsansatzes sind im Kap. 3.5.3.2 (Tab. 3.4 und 3.5) dargelegt. Die in diesem Gel aufgetragenen Produkte des Substanz-P- Rezeptors und seines natürlichen Liganden Hämokinin-1 (HK-1) zeigten in den einzelnen Reaktionen unterschiedliche und instabile Produktgrößen; ein reproduzierbares Reaktionsprodukt ließ sich nicht eruieren, so dass keine Aussage über Substanz-P- Rez. und HK-1 in dieser Arbeit getroffen werden kann. Die Bedingungen der Agarosegelelektrophorese waren U = 100 V, I = 150 mA und P = 50 W bei einer Laufzeit von 1,5 Std.



#### 4.2.5 Der TrkB (gp145) wird nicht von B-Zellen exprimiert

In den Kapiteln 4.2.3 und 4.2.4 konnte gezeigt werden, dass CD45R(B220) positiven B-Zellen des KMs und der Milz keine mRNA für die Expression des trkB(gp 145) enthalten (*Abb. 4.14 und 4.15*) im Gegensatz zu den Zellen des Gehirns (*Abb. 13*) von C57BL/6. Zur Verifizierung dieses Ergebnisses führten wir einen Versuch durch, in dem wir RNA aus dem Gehirn mit der RNA aus den B-Zellen des KM mischten. Das in der nach den etablierten Standardbedingungen ablaufenden qualitativen PCR entstandene Produkt, welches der errechneten Größe für trkB(gp 145) von 452 bp entsprach (*Abb. 4.16*), verglichen wir mit den Produkten der parallel dazu durchgeführten Reaktion mit RNA ausschließlich aus B-Zellen der Milz und des KMs. In diesen beiden Reaktionen zeigte sich kein Produkt, sondern nur Primerdimere (*Abb. 4.16*).



**Abbildung 4.16: Untersuchung der Expression des trkB (gp 145) NT- Rezeptors auf CD45R(B220) positiven B-Zellen des KMs und der Milz**

Diese repräsentative Abbildung eines Agarosegels mit den Produkten der qualitativen PCR der cDNA, transformiert aus mRNA, welche aus CD45R(B220) positiven B-Zellen des KMs und der Milz sowie aus den Zellen des Gehirns von C57BL/6 extrahiert wurde, zeigt, dass die Zellen des Gehirns die genetische Information für den trkB(gp 145)- NT- Rezeptors im Gegensatz zu den B-Lymphozyten der beiden untersuchten Organkompartimenten enthielt. B-Zellen exprimieren demnach nicht diesen NT- Rezeptor. Als interne Kontrolle dieser vereinfachten Versuchsanordnung ist das Produkt mit den Primern für Beta-Aktin aufgetragen. Bei den beiden weit im elektrischen Feld des Agarosegels gelaufenen entstandenen Banden aus der Reaktion mit mRNA ausschließlich aus B-Zellen der Milz und des KMs handelt es sich um Primerdimere. Dies sind aneinander gelagerte Primer für den trkB(gp 145)- NT- Rezeptors, zwischen denen das in der Gelelektrophorese verwendete Ethidiumbromid interkaliert und damit unter UV-Licht sichtbar macht. Beta-Aktin und das entstandene Produkt aus dem RNA- Gemisch aus den Zellen des Gehirns und aus B-Zellen des KMs entsprechen den errechneten Größen in bp (*Metabion GmbH 2002*). Die Bedingungen der Agarosegelelektrophorese waren  $U = 100 \text{ V}$ ,  $I = 150 \text{ mA}$  und  $P = 50 \text{ W}$  bei einer Laufzeit von 1,5 Std.

Damit ließ sich in dieser vereinfachten Experimentanordnung reproduzieren, dass die genetische Information für den trkB(gp 145)- NT- Rezeptor nicht in den B-Zellen der beiden Organkompartimenten vorhanden ist.

### 4.3 Quantitative PCR

Die Ergebnisse der qualitativen PCR zeigten, dass die CD45R(B220) positiven B-Zellen die genetische Information aller in dieser Arbeit untersuchten NT- Rezeptoren und deren Liganden exprimierten außer des trkB(gp 145)- NT- Rezeptors (*Kap. 4.2.3, 4.2.4 und 4.2.5; Abb. 4.14, 4.15 und 4.16*). Diese auf den qualitativen Nachweis hin konzipierten Versuche erbrachten, dass sich die B-Zellen aus den beiden untersuchten Organkompartimenten hinsichtlich ihrer mRNA für die NT- Rezeptoren und NTs nicht unterscheiden. CD45R(B220) positiven B-Zellen des KMs zeigen dasselbe Expressionsmuster wie die auf diesen Pan- B- Zell- Marker positiven B-Lymphozyten der Milz (*Abb. 4.14 und 4.15*). Eine semiquantitative Analyse der Agarosegele mit ihren PCR- Produkten hinsichtlich der Fluoreszenzstärke des eingelagerten Ethidiumbromids mit dem Analyseprogramm GelScan V5.01 ist für diese Versuchsanordnung nicht ausreichend, da mit 42 Zyklen die maximale Zyklenzahl der PCR erreicht ist und eine Differenzierung der Fluoreszenzstärke somit nicht möglich ist. Die entstandenen Produkte zeigen zudem durch die verwendeten Primer in diesem Versuchsdesign per se verschiedene Größen (in bp) (*siehe Tabelle 4.2, Kap. 4.2.1*). Damit lagern diese unterschiedlich stark Ethidiumbromid ein, was zu einer unterschiedlich ausgeprägten Fluoreszenzstärke führt.

Um die Expressionsmuster der B-Zellen aus dem KM mit dem der B-Lymphozyten aus der Milz zu vergleichen, bedienten wir uns der Methodik der quantitativen PCR mittels LightCycler® (*siehe Kap. 3.5.5.1 und 3.5.5.2*). Mit dieser Versuchsanordnung soll die Frage nach Unterschieden hinsichtlich des Gehaltes an genetischer Information für die NT- Rezeptoren und NTs in den B-Zellen des KMs und der Milz geklärt und analysiert werden.

#### 4.3.1 NT- und NT- Rezeptor- Expression im Gehirn als Standard und Kontrolle

Mit den Zellen des ZNS von C57BL/6 Versuchstieren wurde die Methodik der quantitativen Methodik (*siehe Kap. 3.5.5.1 und 3.5.5.2*) mittels LightCycler® etabliert und standardisiert, da diese Zellen die gesuchte Information für die NT- Rezeptoren und NTs beinhalten (*Heumann et al. 1994; Kaplan et al. 1994*). Diese Methodik benötigte aber ein gänzlich anderes Primerdesign (*Tab. 2.12*), da die Primer, die in der qualitativen PCR Verwendung fanden, für die quantitative PCR zu große Produkte lieferte. Die verwendeten Primer der quantitativen PCR amplifizieren ein kleineres Produkt, welches zwischen 100 und 150 bp Länge liegt (*Qiagen QuantiTect™ SYBR® Green PCR Handbook 2002*).

Je größer der Gehalt an mRNA für das jeweilige gesuchte Target ist, desto weniger Zyklen werden benötigt, bis ein im LightCycler® messbarer Anstieg der Fluoreszenz vorliegt. Der Zyklus, in dem dieser Schwellenwert der Fluoreszenzmessung erreicht wird, wird Schwellenzyklus ( $C_T$ ) genannt (*Kap. 3.5.5.1*). Als Vergleich dient der Schwellenzyklus des Beta-Aktins, dessen mRNA in jeder Zelle vorliegt. Vergleicht man die  $C_T$ s der verschiedenen amplifizierten Produkte mit dem  $C_T$  von Beta-Aktin ( $C_{TB-A}$ ), so können die Differenzen eine Aussage darüber machen, für welches gesuchte Produkt mehr genetische Information vorliegt (*Kap. 3.5.5.1*). Die parallel dazu verlaufende Non- Rev.- T- Kontrolle (-RT) gibt einen Aufschluß darüber, ob eine Kontamination mit Fremd- DNA vorliegt und somit die Ergebnisse verwertbar sind oder nicht.

Die Zellen des ZNS exprimieren alle in dieser Arbeit untersuchten NT- Rezeptoren und NTs (*Abb. 4.17 und 4.18; dargestellt sind zur Übersichtlichkeit nur die NTs und NT- Rezeptoren, deren Expression bei der Untersuchung der B-Zellen Differenzen aufwiesen. Die Untersuchungen der anderen NTs und –Rezeptoren erbrachten keine brauchbaren Informationen bei der Untersuchung der B-Zellen*).



Im Vergleich der einzelnen Schwellenzyklen der NTs und NT-Rezeptoren zu dem Schwellenzyklus des Beta-Aktins ( $C_T$ B-A) in den Zellen des ZNS lässt sich Reihenfolge abnehmender Expression für die untersuchten NTs und NT-Rezeptoren konstatieren (Tab. 4.3):

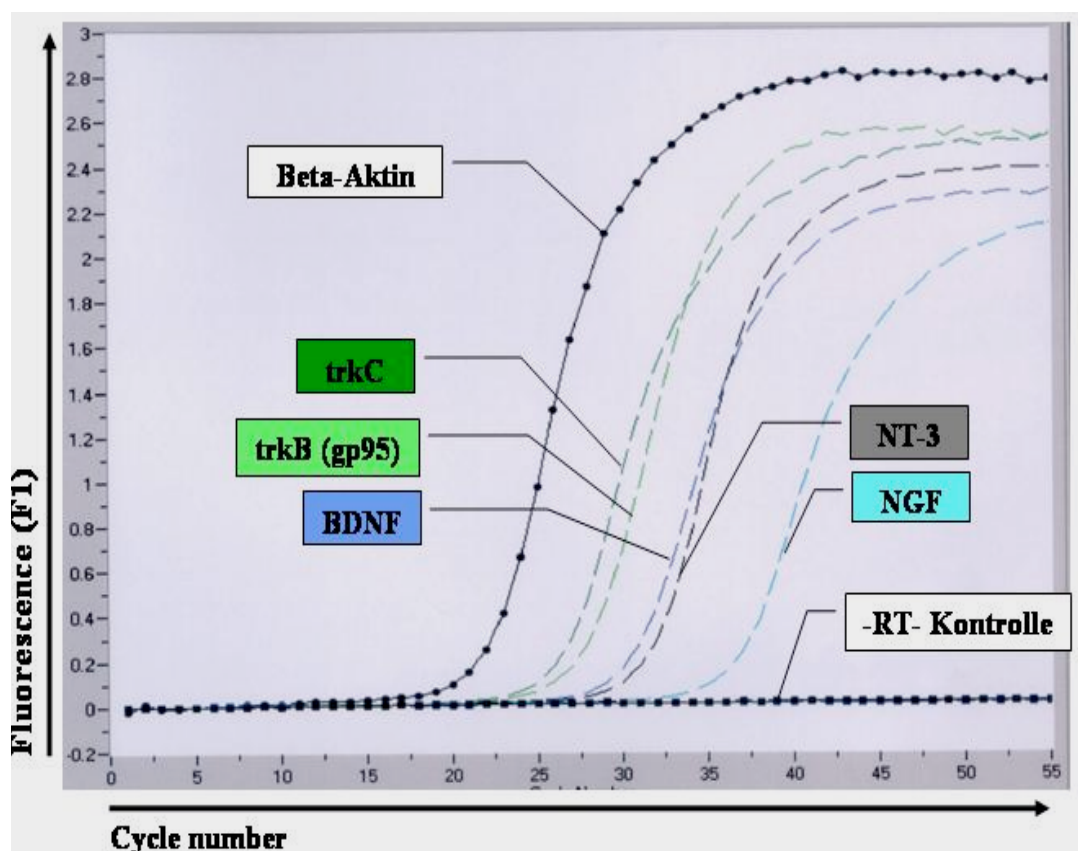
Target	$C_T$	$\Delta C_T$ B-A – $C_T$ ...
Beta-Aktin ( $C_T$ B-A)	22,10	-
trkC ( $C_T$ trkC)	26,27	<b>4,17</b>
trkB(gp 95) ( $C_T$ trkB)	27,93	<b>5,83</b>
BDNF ( $C_T$ BDNF)	30,58	<b>8,48</b>
NT-3 ( $C_T$ NT-3)	31,54	<b>9,44</b>
NGF ( $C_T$ NGF)	36,65	<b>14,55</b>

**Tabelle 4.3: Differenz der Schwellenzyklen der NTs und NT- Rezeptoren aus dem Gehirn von C57BL/6 mit dem  $C_T$  des Beta-Aktins.**

Je größer der Gehalt der mRNA für die jeweiligen untersuchten NTs und NT- Rezeptoren, desto früher kommt es zu einem messbaren Anstieg der Fluoreszenz in der quantitativen PCR- Reaktion. Der Zyklus, an dem diese Schwelle erreicht wird, nennt man Schwellenzyklus  $C_T$ . Vergleicht man die Schwellenzyklen der jeweiligen Produkte mit dem  $C_T$  des Beta-Aktins ( $C_T$ B-A), was als interne Kontrolle der PCR dient, so können die Differenzen eine Aussage darüber machen, für welche Produkte mehr genetische Information vorliegt. D.h. um so kleiner die Differenz zwischen dem  $C_T$  des Beta-Aktins und des Schwellenzyklus des gesuchten Neurotrophins ist, desto mehr genetische Information für das jeweilige NT bzw. NT- Rezeptor ist in der Zelle vorhanden, da mit steigender Menge an mRNA in der Zelle die Fluoreszenzintensität früher ansteigt und der Schwellenzyklus früher erreicht wird. Je größer die Differenz zwischen dem  $C_T$ B-A und dem  $C_T$  des gesuchten NT bzw. NT- Rezeptor, desto weniger genetische Information ist für das gesuchte Target in der Zelle vorhanden. In dieser Tabelle sind die Ergebnisse der quantitativen PCR für BDNF, NGF, NT-3, trkC und trkB(gp 95) mit ihren jeweiligen Schwellenzyklen dargestellt. Die Ergebnisse der anderen NTs und NT- Rezeptoren sind nicht dargestellt, da diese bei den Versuchen mit den B-Zellen keine brauchbaren Informationen lieferten. Vergleicht man die Differenzen zwischen dem  $C_T$  des Beta-Aktins und des jeweiligen Targets, so lässt sich eine Reihenfolge mit abnehmender Häufigkeit für die jeweiligen Produkte aufzeigen: **trkC > trkB(gp 95) > BDNF > NT-3 > NGF** (Abb. 4.17 und Abb. 4.18).

**trkC > trkB(gp 95) > BDNF > NT-3 > NGF**

Die Untersuchung der Schmelzkurven für die jeweiligen Produkte lässt sich die Spezifität der Amplifikation überprüfen (Abb. 4.18). Die Schmelzkurven für die untersuchten Produkte aus den Zellen des Gehirns zeigen, dass sich keine Primerdimere bei niedrigerer Temperatur gebildet haben (Abb. 4.18; siehe Kap. 3.5.5.1 und Abb. 3.16) und die entstandenen Produkte für die verwendeten Primer spezifisch sind.

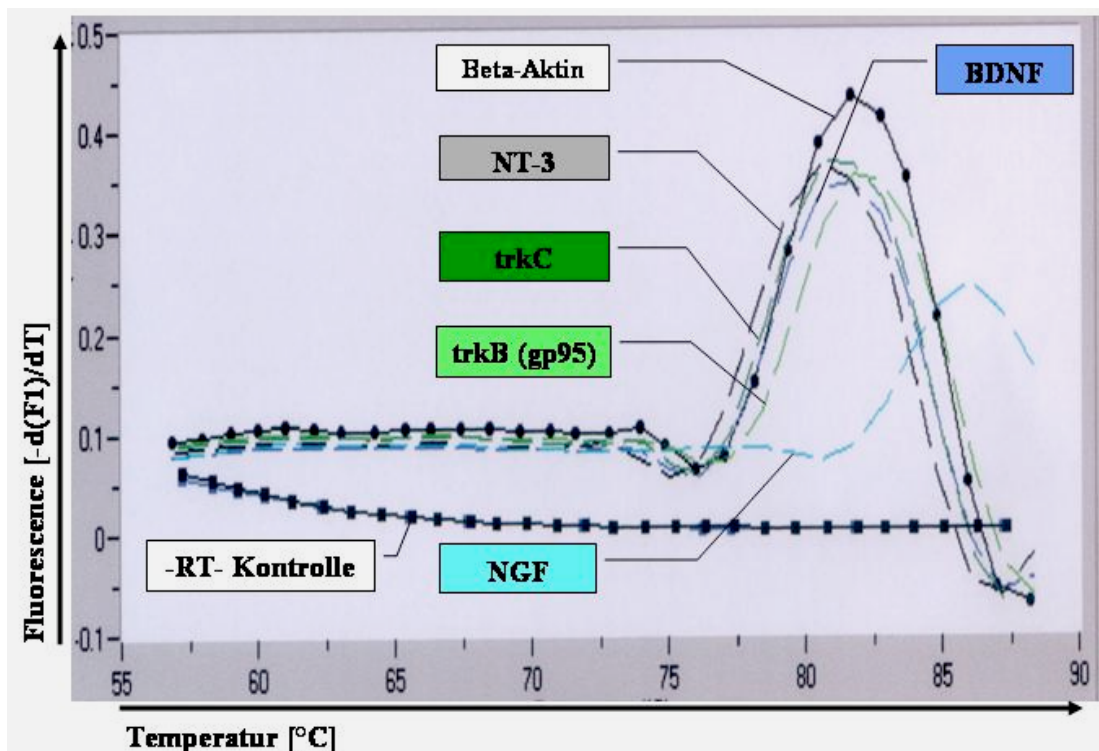


**Abbildung 4.17: Standardisierung und Etablierung der Methodik der quantitativen PCR mittels LightCycler® mit den Zellen aus dem Gehirn von C57BL/6- Wildtypmäusen**

Diese Abbildung zeigt die Ergebnisse der quantitativen PCR mit den Zellen des Gehirns aus C57BL/6. Dargestellt ist der Anstieg der Fluoreszenz in Bezug zum jeweiligen Zyklus der PCR. Dieser Anstieg ist abhängig von dem jeweiligen Gehalt an genetischer Information für den untersuchten NT- Rezeptor bzw. das untersuchte Neurotrophin. Aus der Baseline, in der Regel vom dritten bis zum 15. Zyklus, kommt es zu keinem detektierbaren Anstieg der Fluoreszenz. Je nach Gehalt an mRNA für das untersuchte Target steigt die Fluoreszenz an, d.h., dass es kommt zu einem detektierbaren Anstieg an PCR- Produkten (*siehe Kap. 3.5.5.1 und Abb. 3.14*). Der Zyklus, in dem es zu einem messbaren Anstieg der Fluoreszenz kommt, nennt man Schwellenzyklus ( $C_T$ ) (*hier aus Gründen der Übersicht nicht dargestellt*). Je früher die detektierbare Fluoreszenz ansteigt, desto mehr mRNA für das gesuchte Produkt ist vorhanden, d.h. desto früher ist der Schwellenzyklus erreicht. Im Vergleich mit einem internen Standard – hier Beta-Aktin – kann man eine Aussage darüber treffen, für welches Produkt mehr genetische Information vorliegt. In der vorliegenden Abbildung sind die NT- Rezeptoren trkC und trkB(gp 95) und die NTs NGF, NT-3 und BDNF dargestellt. Die anderen Rezeptoren und Liganden sind aus Gründen der Übersicht nicht dargestellt, da diese in der Untersuchung der B-Zellen keine brauchbaren Ergebnisse lieferten.

Die erreichten Schwellenzyklen werden mit dem Schwellenzyklus des Beta-Aktins verglichen. Die Differenzen ( $\Delta C_T \text{ B-A} - C_T \dots$ ) geben einen Aufschluß darüber, für welchen Rezeptor oder welchen Liganden mehr mRNA vorliegt (*Tab. 4.3*). Je kleiner die errechnete Differenz, desto früher steigt die Fluoreszenzintensität an und desto früher wird der Schwellenzyklus  $C_T$  erreicht. Aus diesem hier dargestellten Versuch ergibt sich folgende Reihenfolge abnehmender Häufigkeit: **trkC > trkB(gp 95) > BDNF > NT-3 > NGF**.

Die methodischen Bedingungen für diese quantitativen Untersuchungen sind im Kap. 3.5.5.1 dargestellt.



**Abbildung 4.18: Schmelzkurve der PCR-Produkte aus dem Versuch der Standardisierung und Etablierung der quantitativen PCR mit Zellen des Gehirns**

In dieser Abbildung sind die Schmelzkurven der untersuchten Produkte dargestellt. Es zeigen sich hier keine Primerdimere bei niedrigeren Temperaturen. Um die Spezifität der amplifizierten Produkte der kinetischen PCR zu überprüfen, wurde in dieser Arbeit die Schmelzkurven-Analyse (Abb. 3.16 in Kap. 3.5.5.1) angewandt. Dabei wird die Temperatur langsam von ca. 60°C bis auf die Schmelztemperatur  $T_m$  (95°C) erhöht. Bei niedrigen Temperaturen liegen alle PCR-Produkte als Doppelstrang vor. In diesem Stadium ist SYBR® Green I gebunden und die Fluoreszenzintensität hoch. Während der Denaturierung der PCR-Produkte lösen sich die Doppelstränge in Einzelstränge, was zu einem langsamen Nachlassen der Fluoreszenzintensität führt, da sich auch der Fluoreszenzfarbstoff aus der Bindung löst. Ist die Schmelztemperatur der entstandenen PCR-Produkte, spezifische wie nicht spezifische, erreicht, nimmt die detektierte Fluoreszenzintensität sehr schnell ab, da die Moleküle bei ihrer  $T_m$  schneller denaturieren. Diese schnelle Abnahme wird vom Computer in der ersten mathematischen Ableitung ( $-dF/dT$ ) berechnet und als ein Gipfel dargestellt (Abb. 3.16). Die Schmelztemperatur der spezifischen Produkte liegt höher als die der nicht spezifischen Produkte, da diese kleiner sind und sich schon bei niedrigen Temperaturen in Einzelstränge aufteilen. Dies wird durch einen eventuellen Anstieg der Fluoreszenz bei niedrigen Temperaturen angezeigt. In dieser hier vorliegenden Abbildung ist ersichtlich, dass keine unspezifischen Produkte wie Primerdimere vorliegen. Die Produkte für NGF haben einen höheren Schmelzpunkt als die übrigen PCR-Produkte. Diese Schmelzkurvendarstellung mit den Zellen aus dem Gehirn dient als Standard für die weiteren Versuche mit den B-Zellen aus dem KM und der Milz, um die Spezifität der entstehenden PCR-Produkte zu überprüfen. Die Amplifikationsprodukte der Primer für NGF haben im Unterschied zu den anderen PCR-Produkten eine höhere Schmelztemperatur. Dieser Unterschied ließ sich reproduzieren.

#### 4.3.2 Neurotrophin- Expression der B-Zellen von KM und der Milz

In den weiteren Versuchen untersuchten wir die Frage, ob sich die in der qualitativen PCR nachgewiesenen NTs und NT- Rezeptoren in den B-Zellen aus den beiden Kompartimenten hinsichtlich ihrer Quantität unterscheiden. Als Vergleich und interner Standard dient auch hier Beta-Aktin. Der Schwellenzyklus von Beta-Aktin ( $C_T$ B.-A.) von den B-Zellen des KMs und der Milz ist in den Versuchen identisch ( Abb. 4.19, 4.20 und 4.21, Tab. 4,4), d.h., dass die B-Lymphozyten aus dem KM und der Milz die gleiche Menge an mRNA für Beta-Aktin enthalten, so dass ein direkter Vergleich der NT-Expression der B-Zellen - unter Berücksichtigung der Expression von Beta-Aktin - aus den unterschiedlichen lymphatischen Organen (Milz und KM) untereinander möglich ist.

Die quantitative Untersuchung der genetischen Information für die Neurotrophine in den B-Zellen aus der Milz und des KMs zeigte erbrachte für BDNF, NT-3 und NGF folgende Ergebnisse:

1. Analog zu den Ergebnissen aus den Zellen des Gehirns von C57BL/6 lässt sich im Vergleich zum dem  $C_T$  des Beta-Aktins und des jeweiligen Targets eine Reihenfolge mit abnehmender Häufigkeit für die jeweiligen Neurotrophine der einzelnen Organe aufzeigen.

Für die B-Zellen der Milz lässt sich folgende Reihenfolge abnehmender Häufigkeit konstatieren:

**NT-3 > NGF > BDNF** (siehe Tab. 4.4)

Für die B-Lymphozyten aus dem KM:

**NT-3 > BDNF > NGF** (siehe Tab. 4.4)

*(Daten aus den Untersuchungen der anderen Neurotrophine nicht gezeigt, da diese keine verwertbaren Ergebnisse lieferten.)*

2. Unterschiede zwischen den CD45R(B220) positiven Zellen aus der Milz und dem KM bestehen auch im Gehalt an mRNA für die einzelnen NTs und somit im Anstieg der detektierten Fluoreszenzintensität und des Schwellenzyklus. (Tab. 4.4; Abb. 4.19, 4.20, 4.21). Die Differenz ( $\Delta$ ) zu dem  $C_T$  des Beta-Aktins, welches für die B-Zellen des KMs und der Milz gleich ist, zeigt diese Unterschiede auf. Wird der Schwellenzyklus für ein bestimmtes NT erst spät erreicht – sind also mehrere Zyklen notwendig bis es zu einem detektierbaren Fluoreszenzanstieg kommt –, ist die Differenz ( $\Delta C_{TB-A} - C_{T...}$ ) größer, als wenn der Schwellenzyklus früher erreicht wird.

Je größer diese Differenz, desto weniger genetische Information für das betreffende NT liegt in der B-Zelle vor.

Vergleicht man diese Differenzen ( $\Delta C_{TB-A} - C_{T...}$ ) für ein bestimmtes NT aus den B-Lymphozyten des KMs mit denen der Milz, so lässt sich eine Aussage darüber treffen, ob die CD45R(B220) positiven Zellen aus der Milz oder aus dem KM mehr mRNA für dieses NT enthalten.

Target	$C_T$	$\Delta C_{TB-A} - C_{T...}$
Beta-Aktin (Milz)	<b>17,24</b>	-
Beta-Aktin (KM)		
BDNF (Milz)	51,00	<b>33,76</b>
BDNF (KM)	39,04	<b>21,8</b>
NT-3 (Milz)	37,00	<b>19,76</b>
NT-3 (KM)	38,06	<b>20,82</b>
NGF (Milz)	38,30	<b>21,06</b>
NGF (KM)	40,16	<b>22,92</b>

**Tabelle 4.4: Vergleich der Schwellenzyklen zwischen Beta-Aktin und BDNF, NT-3 sowie NGF für die B-Zellen aus dem KM und der Milz**

In dieser Tabelle sind die Schwellenzyklen  $C_T$  – Zyklen, bei denen ein eindeutiger Anstieg der Fluoreszenz zu messen sind – für die einzelnen untersuchten NTs BDNF, NGF und NT-3 dargestellt. Als Vergleich dient hier Beta-Aktin, welches in den B-Zellen der Milz und des KMs den gleichen  $C_T$  aufweist. Dies hat den Vorteil, dass man die Expression der NTs der B-Lymphozyten aus den beiden Kompartimenten direkt miteinander vergleichen kann ( $\Delta C_{TB-A} - C_{T...}$ ). So ist es möglich auch geringe Unterschiede zwischen den B-Zellen aus Milz und KM darzustellen. Anhand der errechneten Differenzen zum  $C_T$  des Beta-Aktins zeigt sich, dass die Zellen der CD45R(B220) positiven B-Zellen aus dem KM mehr genetische Information für BDNF enthalten als die B-Lymphozyten der Milz (Abb. 4.19), da der Schwellenzyklus für BDNF aus den Zellen des KMs früher erreicht wird – also eine geringere Differenz zum Schwellenzyklus des Beta-Aktins besteht (21,8 [KM] zu 33,76 [Milz]). Die B-

Lymphozyten der Milz enthalten jedoch mehr mRNA für die Neurotrophine NGF (21,06 [Milz] zu 22,92 [KM]) und NT-3 (19,76 [Milz] zu 20,82 [KM]) als die B-Zellen des KMs (*Abb. 4.20 und 4.21*). Für die B-Zellen der Milz lässt sich folgende Reihenfolge abnehmender Häufigkeit konstatieren: **NT-3 > NGF > BDNF** (19,76 zu 21,06 zu 33,76). Für die B-Lymphozyten aus dem KM: **NT-3 > BDNF > NGF** (20,82 zu 21,8 zu 22,92).

Für die Neurotrophine BDNF, NGF und NT-3 können hinsichtlich der quantitativen Untersuchung der B-Zellen der Milz im Vergleich mit denen des KMs folgende Aussagen getroffen werden:

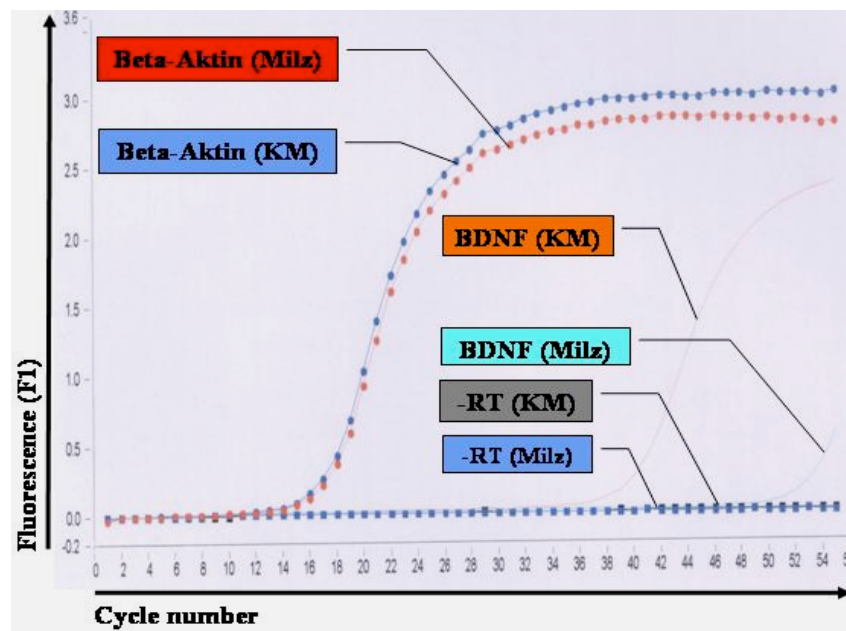
**A.** B-Zellen des KMs zeigen eine höhere Expression für das NT BDNF als die CD45R(B220) positiven Zellen der Milz (*Abb. 4.19; Tab. 4.4 und 4.5*), da der Schwellenzyklus für BDNF aus den Zellen des KM früher erreicht wird und damit die errechnete Differenz zu dem  $C_T$  des Beta-Aktins ( $\Delta C_T B-A - C_T \dots$ ) kleiner ist (21,8 [KM] zu 33,76 [Milz]). Es sind also weniger Zyklen notwendig, um einen detektierbaren Fluoreszenzanstieg zu erreichen.

**B.** Bei der quantitativen Untersuchung der B-Lymphozyten aus der Milz wird für die NTs NGF und NT-3 der Schwellenzyklus früher erreicht als für die B-Zellen aus dem KM. D.h., dass diese mehr mRNA für NGF (21,06 [Milz] zu 22,92 [KM]) und NT-3 (19,76 [Milz] zu 20,82 [KM]) besitzen als die untersuchten Zellen aus dem KM (*Abb. 4.20 und 4.21; Tab. 4.4 und 4.5*).

Target	$\Delta C_T B-A - C_T KM$	$\Delta C_T B-A - C_T (Milz)$	$\Delta [ \Delta C_T B-A - C_T KM ] - [ \Delta C_T B-A - C_T Milz ]$
<b>BDNF</b>	21,8	33,76	<b>11,96</b>
<b>NGF</b>	22,92	21,06	<b>1,86</b>
<b>NT-3</b>	20,82	19,76	<b>1,06</b>

**Tabelle 4.5: Ergebnisse der quantitativen Untersuchung der NTs für die CD45R(B220) positiven Zellen aus dem KM und der Milz im Vergleich**

Die Tabelle zeigt, dass es Unterschiede in dem genetischen Gehalt für die NTs BDNF, NGF und NT-3 für die B-Zellen des KMs und der Milz gibt. Als interner Standard wurde der ermittelte Schwellenzyklus für Beta-Aktin verwendet, der für die B-Zellen der beiden untersuchten Kompartimenten gleich ist. Die ermittelten Differenzen für die B-Lymphozyten der Milz und des KMs wurden miteinander verglichen. Dabei zeigte sich, dass die CD45R(B220) positiven Zellen des KMs mehr genetische Information für BDNF enthalten als die der Milz (*Abb. 4.19; Tab. 4.4*). Umgekehrt enthalten die B-Zellen der Milz mehr mRNA für NGF und NT-3 als die des KMs (*Abb. 4.20, 4.21; Tab. 4.4*). Die Differenz  $\Delta [ \Delta C_T B-A - C_T KM ] - [ \Delta C_T B-A - C_T Milz ]$  zeigt die Anzahl der Zyklen auf, worin sich die B-Zellen der Milz und des KMs unterscheiden.



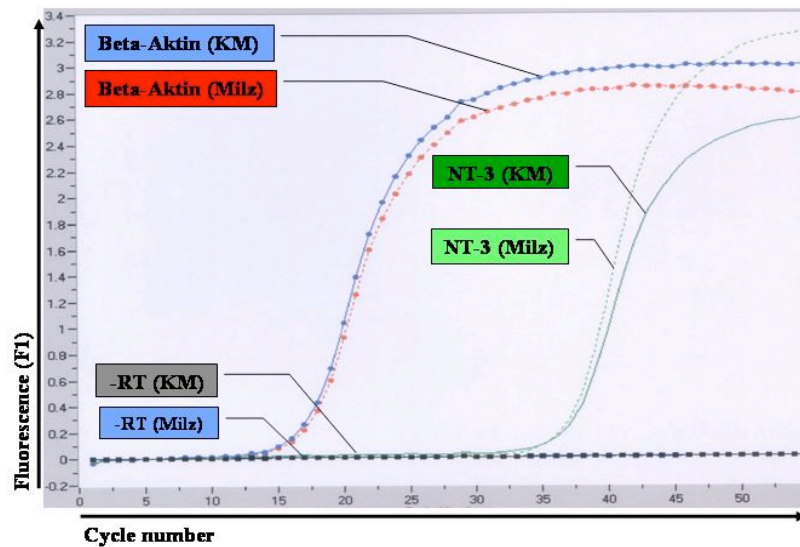
**Abbildung 4.19: Quantitative Darstellung der BDNF- Expression der B-Zellen des KMs und der Milz**

In dieser Abbildung ist der Anstieg der Fluoreszenz gegenüber der Zyklenzahl mit den Primern für BDNF mit den B-Zellen aus dem KM und der Milz aufgetragen. Es zeigt sich ein deutlicher Unterschied des Zeitpunktes des Anstieges der Fluoreszenz. Dargestellt ist der Anstieg der Fluoreszenz in Bezug zum jeweiligen Zyklus der PCR. Dieser Anstieg ist abhängig von dem jeweiligen Gehalt an genetischer Information für den untersuchten NT-Rezeptor bzw. das untersuchte Neurotrophin. Aus der Baseline, in der Regel vom dritten bis zum 15. Zyklus (Kap. 3.5.5.1; Abb. 3.14), kommt es zu keinem detektierbaren Anstieg der Fluoreszenz. Je nach Gehalt an mRNA für das untersuchte Target steigt die Fluoreszenz an, d.h., dass es kommt zu einem detektierbaren Anstieg an PCR- Produkten (siehe Kap. 3.5.5.1 und Abb. 3.14). Der Zyklus, in dem es zu einem messbaren Anstieg der Fluoreszenz kommt, nennt man Schwellenzyklus ( $C_T$ ) (hier aus Gründen der Übersicht nicht dargestellt). Je früher die detektierbare Fluoreszenz ansteigt, desto mehr mRNA für das gesuchte Produkt ist vorhanden, d.h. desto früher ist der Schwellenzyklus erreicht. Im Vergleich mit einem internen Standard – hier Beta-Aktin – kann man eine Aussage darüber treffen, für welches Produkt mehr genetische Information in der B-Zelle des jeweiligen Organkompartimentes vorliegt (Tab. 4.4 und 4.5).

B-Zellen des KMs enthalten mehr genetische Information für das NT BDNF als die CD45R(B220) positiven Zellen der Milz, da der Schwellenzyklus für BDNF aus den Zellen des KM früher erreicht wird und damit die errechnete Differenz zu dem  $C_T$  des Beta-Aktins ( $\Delta C_{TB-A} = C_T \dots$ ) kleiner ist (21,8 [KM] zu 33,76 [Milz]) (Tab. 4.4 und 4.5, Kap. 4.3.2 Ergebnis A).

PCR-Standards entsprechen den Bedingungen, die im Kap. 3.5.5.2 dargelegt sind.



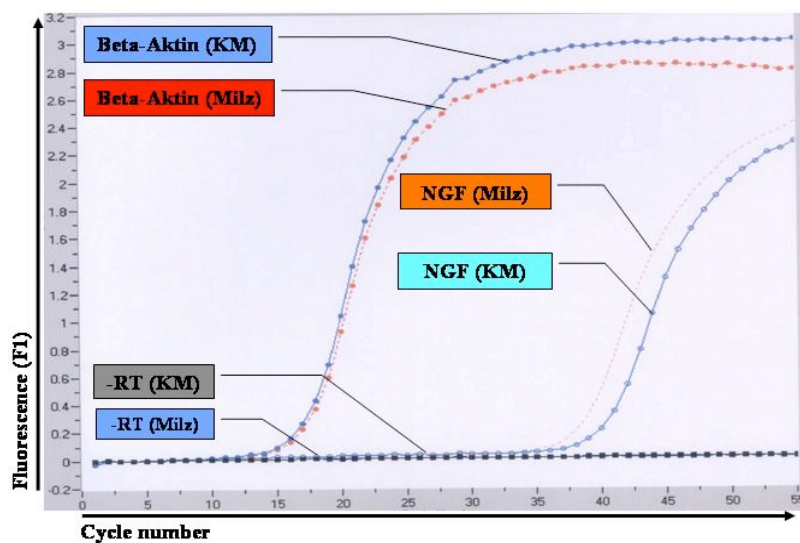


**Abbildung 4.20: Quantitative Darstellung der NT-3- Expression der B-Zellen des KMs und der Milz**

(Grundlagen dieser Darstellung siehe bitte Abb. 4.19 und Kap. 3.5.5.1 und Abb. 3.14)

Bei der quantitativen Untersuchung der B-Lymphozyten aus der Milz wird für das NT NT-3 der Schwellenzyklus früher erreicht als für die B-Zellen aus dem KM. D.h., dass diese mehr mRNA für NT-3 (19,76 [Milz] zu 20,82[KM]) besitzen als die untersuchten Zellen aus dem KM (Tab. 4.4 und 4.5; Kap. 4.3.2 Ergebnis B).

PCR-Standards entsprechen den Bedingungen, die im Kap. 3.5.5.2 dargelegt sind.



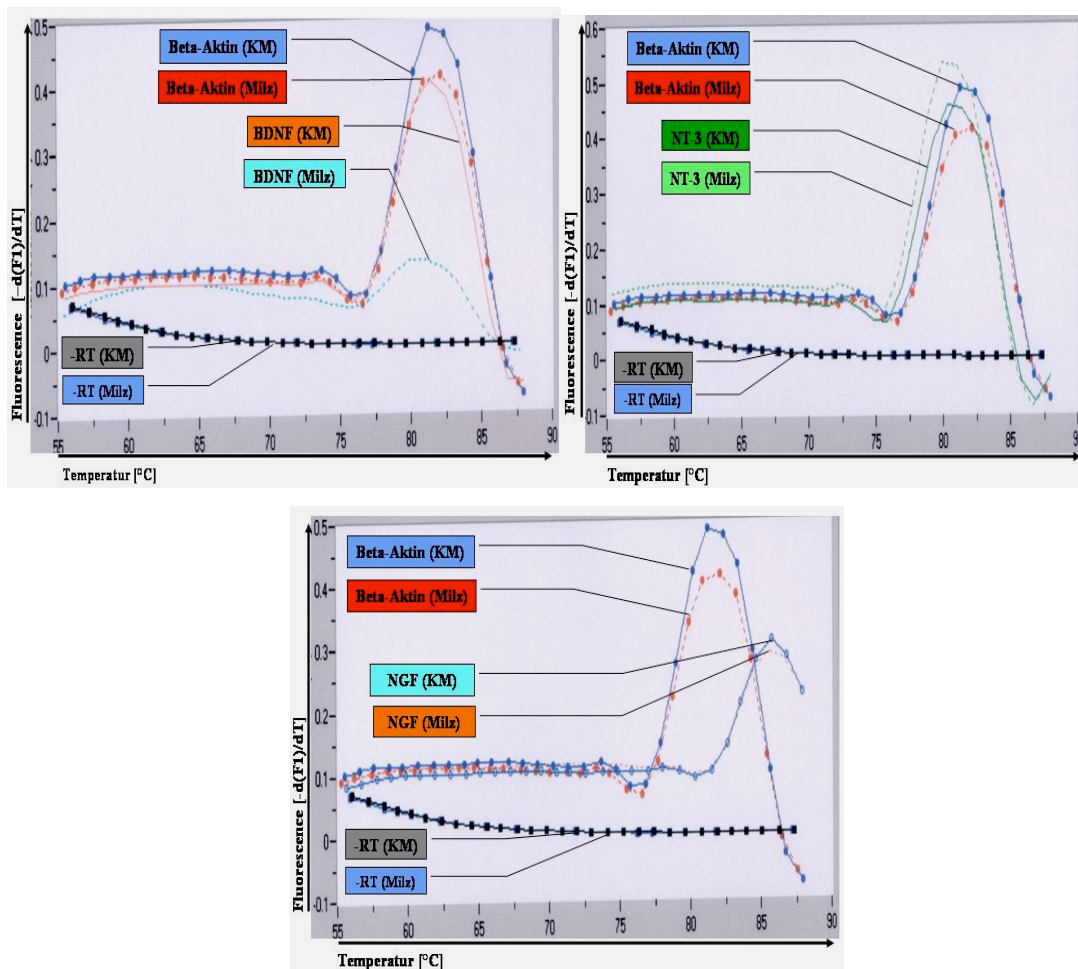
**Abbildung 4.21: Quantitative Darstellung der NGF- Expression der B-Zellen des KMs und der Milz**

(Grundlagen dieser Darstellung siehe bitte Abb. 4.19 und Kap. 3.5.5.1 und Abb. 3.14)

Bei der quantitativen Untersuchung der B-Lymphozyten aus der Milz wird für das NT NGF der Schwellenzyklus früher erreicht als für die B-Zellen aus dem KM. D.h., dass diese mehr mRNA für NGF (21,06 [Milz] zu 22,92 [KM]) und besitzen als die untersuchten Zellen aus dem KM (Tab. 4.4 und 4.5; Kap. 4.3.2 Ergebnis B).

PCR-Standards entsprechen den Bedingungen, die im Kap. 3.5.5.2 dargelegt sind.





**Abbildung 4.22: Schmelzkurvendarstellung der Neurotrophine BDNF, NT-3 und NGF aus den B-Zellen der Milz und aus dem KM**

In dieser Abbildung sind die Schmelzkurven der untersuchten Produkte dargestellt. Es zeigen sich hier keine Primerdimere bei niedrigeren Temperaturen. (Für die genaue Beschreibung der Grundlagen dieser Abbildungsart siehe bitte Abb. 4.18, Kap. 3.5.5.1 und Abb. 3.16)

Die Produkte für NGF haben einen höheren Schmelzpunkt als die übrigen PCR-Produkte, ihre Schmelztemperatur liegt höher als die der Produkte für die Primer der anderen NTs (BDNF und NT-3). Diese Schmelzkurvendarstellung zeigt, dass während des Amplifikationsvorganges keine unspezifischen Produkte mit niedriger Schmelztemperatur entstanden sind. Der Gipfel der ersten Ableitung der Schmelzkurvenanalyse der Produkte aus der quantitativen PCR für BDNF aus den B-Zellen der Milz ist gering ausgeprägt, da sich nur erheblich weniger Amplifikationsprodukte gebildet haben aufgrund geringerer genetischer Information als bei den B-Lymphozyten des KMs. Die Amplifikationsprodukte der Primer für NGF haben eine höhere Schmelztemperatur als die anderen PCR-Produkte. Dies wurde schon in den Standardisierungsversuchen mit Zellen des Gehirns für C57BL/6 aufgezeigt (siehe Abb. 4.18).

#### 4.3.3 Neurotrophin- Rezeptor- Expression der B-Zellen von KM und der Milz

Hinsichtlich der Expressionsanalyse der NT- Rezeptoren der B-Zellen im KM und in der Milz gingen wir analog der Untersuchung der NTs vor.

Die quantitative Untersuchung der genetischen Information für die Neurotrophin- Rezeptoren erbrachte für trkB(gp 95) und trkC folgende Ergebnisse:

1. Analog zu den Ergebnissen der NT- Analyse läßt sich im Vergleich zum dem C<sub>T</sub> des Beta-Aktins und des jeweiligen Targets eine Reihenfolge mit abnehmender Häufigkeit für die jeweiligen Neurotrophin- Rezeptoren und Organ aufzeigen.

Für die B-Zellen läßt sich folgende Reihenfolge abnehmender Häufigkeit konstatieren, die für die B-Lymphozyten aus der Milz und des KMs gleich ist:

**trkC > trkB(gp 95)** (siehe Tab. 4.6)

*(Der zudem untersuchte NT- Rezeptor trkB(gp 145) ließ sich nur im Gehirn, jedoch nicht in den B-Zellen aus KM und Milz nachweisen [siehe Kap.4.2.5])*

2. Unterschiede der NT- Rezeptor- Expression zwischen den B-Lymphozyten der Milz und des KMs bestehen im Gehalt an mRNA für die einzelnen NT- Rezeptoren und somit im Anstieg der detektierten Fluoreszenzintensität und des Schwellenzyklus. (Tab. 4.6; Abb. 4.23, 4.24). Dabei ist zu bemerken, dass der Unterschied in der quantitativen PCR für trkC fast einen Zyklus entspricht (21,81 [Milz] zu 21,05 [KM]), während für trkB(gp 95) der unterschied nur sehr gering ist (25,55 [Milz] zu 25,85 [KM]).

Es lassen sich somit folgende Ergebnisse formulieren:

**A.** Die B-Zellen des KMs enthalten mehr genetische Information für den NT- Rezeptor trkC als die der Milz, da weniger Zyklen benötigt werden, um eine detektierbare Fluoreszenzintensität (den Schwellenzyklus C<sub>T</sub>...) zu

erreichen. Die Differenz  $\Delta C_T B-A - C_T \dots$  ist somit kleiner (21,81 [Milz] zu 21,05 [KM]) (siehe Tab. 4.6, 4.7 und Abb. 4.24).

**B.** Die B-Lymphozyten aus der Milz enthalten nur geringfügig mehr mRNA für den NT- Rezeptor trkB(gp 95) als die Zellen des KMs (25,55 [Milz] zu 25,85 [KM]) (siehe Tab. 4.6, Abb. 4.23). Der detektierte Unterschied ist hier nur sehr gering. Eine eindeutige Differenz von einem Zyklus oder mehr ließ sich in wiederholten Versuchen nicht aufzeigen (Tab. 4.7).

Target	$C_T$	$\Delta C_T B-A - C_T \dots$
Beta-Aktin (Milz)	<b>17,24</b>	-
Beta-Aktin (KM)		
trkC (Milz)	39,05	<b>21,81</b>
trkC (KM)	38,74	<b>21,05</b>
trkB(gp 95) (Milz)	42,79	<b>25,55</b>
trkB(gp 95) (KM)	43,09	<b>25,85</b>

**Tabelle 4.6: Vergleich der Schwellenzyklen zwischen Beta-Aktin und trkC und trkB(gp 95) für die B-Zellen aus dem KM und der Milz**

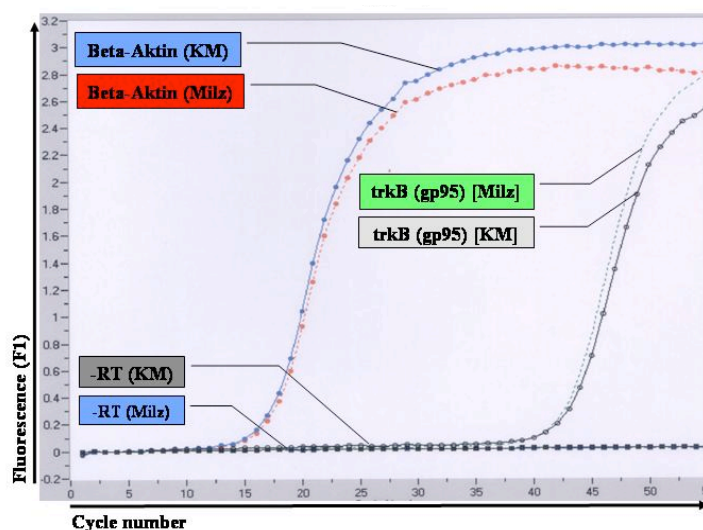
In dieser Tabelle sind die Schwellenzyklen  $C_T$  für die einzelnen untersuchten NT-Rezeptoren trkB(gp 95) und trkC dargestellt. Als Vergleich dient hier Beta-Aktin, welches in den B-Zellen der Milz und des KMs den gleichen  $C_T$  aufweist. Dies hat den Vorteil, dass man die Expression der NTs der B-Lymphozyten aus den beiden Kompartimenten direkt miteinander vergleichen kann ( $\Delta C_T B-A - C_T \dots$ ). Geringe Unterschiede in der Expression der NT-Rezeptoren zwischen den CD45R(B220) positiven Zellen der Milz und des KMs können somit dargestellt werden. Die B-Zellen des KMs enthalten mehr genetische Information für den NT-Rezeptor trkC als die der Milz, da weniger Zyklen benötigt werden, um eine detektierbare Fluoreszenzintensität (den Schwellenzyklus  $C_T \dots$ ) zu erreichen. Die Differenz  $\Delta C_T B-A - C_T \dots$  ist somit kleiner (21,81 [Milz] zu 21,05 [KM]) (siehe Abb. 4.24). Die B-Lymphozyten aus der Milz enthalten nur geringfügig mehr mRNA für den NT-Rezeptor trkB(gp 95) als die Zellen des KMs (25,55 [Milz] zu 25,85 [KM]) (siehe Abb. 4.23). Der detektierte Unterschied ist hier nur sehr gering. Eine eindeutige Differenz von einem Zyklus oder mehr ließ sich in wiederholten Versuchen nicht aufzeigen (Tab. 4.7).

Für die B-Zellen läßt sich folgende Reihenfolge abnehmender Häufigkeit konstatieren, die für die B-Lymphozyten aus der Milz und des KMs gleich ist: **trkC > trkB(gp 95)** (21,81 [trkC Milz], 21,05 [trkC KM] zu 25,55 [trkB(gp 95) Milz], 25,85 [trkB(gp 95) KM]).

Target	$\Delta C_T B-A - C_T KM$	$\Delta C_T B-A - C_T (Milz)$	$\Delta [\Delta C_T B-A - C_T KM] - [\Delta C_T B-A - C_T Milz]$
trkB(gp 95)	25,85	25,55	0,3
trkC	21,05	21,81	0,76

**Tabelle 4.7: Ergebnisse der quantitativen Untersuchung der NT- Rezeptoren für die CD45R(B220) positiven Zellen aus dem KM und der Milz im Vergleich**

In dieser Tabelle wurden die ermittelten Differenzen (im Vergleich zum  $C_T$  des Beta-Aktins) für die B-Lymphozyten der Milz und des KMs miteinander verglichen. Der Unterschied im genetischen Gehalt für den NT- Rezeptor trkC beträgt 0,76, also fast einen gesamten Zyklus. Die ermittelte Differenz hinsichtlich des Gehaltes an mRNA für den trkB(gp 95)-Rezeptor beträgt nur 0,3 und ist somit als nur sehr gering anzunehmen.

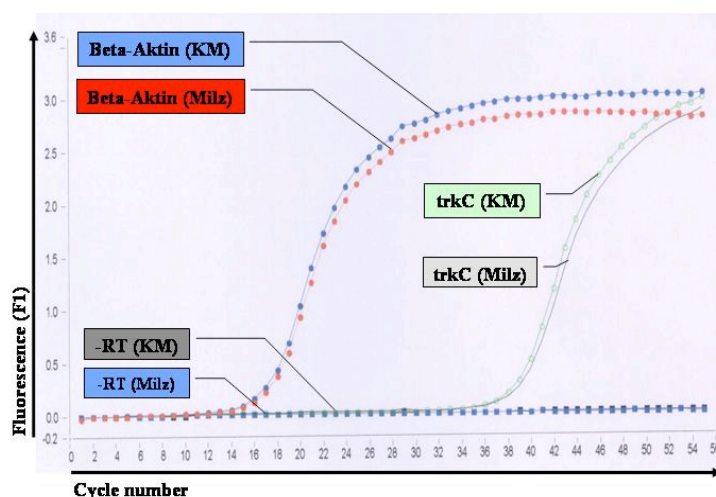


**Abbildung 4.23: Quantitative Darstellung der trkB(gp 95)- Expression der B-Zellen des KMs und der Milz**

(Grundlagen dieser Darstellung siehe bitte Abb. 4.19 und Kap. 3.5.5.1 und Abb. 3.14)

Bei der quantitativen Untersuchung der B-Lymphozyten aus der Milz wird für das NT-Rezeptor trkB(gp 95) der Schwellenzyklus früher erreicht als für die B-Zellen aus dem KM. D.h., dass diese mehr mRNA für trkB(gp 95) (25,55 [Milz] zu 25,85 [KM]) und besitzen als die untersuchten Zellen aus dem KM (Tab. 4.6 und 4.7; Kap. 4.3.3 Ergebnis B). Dieser Unterschied ist aber nur äußerst gering.

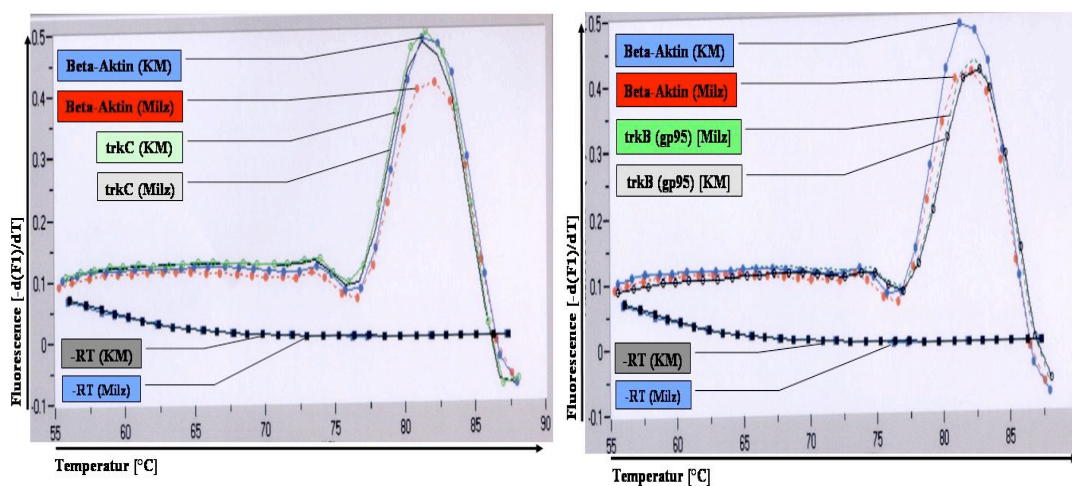
PCR-Standards entsprechen den Bedingungen, die im Kap. 3.5.5.2 dargelegt sind.



**Abbildung 4.24: Quantitative Darstellung der trkC- Expression der B-Zellen des KMs und der Milz**

B-Zellen des KMs enthalten mehr genetische Information für das NT- Rezeptor trkC als die CD45R(B220) positiven Zellen der Milz, da der Schwellenzyklus für BDNF aus den Zellen des KM früher erreicht wird und damit die errechnete Differenz zu dem  $C_T$  des Beta-Aktins ( $\Delta C_T = B - A - C_T$ ) kleiner ist (21,05 [KM] zu 21,81 [Milz]) (Tab. 4.6 und 4.7, Kap. 4.3.3 Ergebnis A).

PCR-Standards entsprechen den Bedingungen, die im Kap. 3.5.5.2 dargelegt sind.



**Abbildung 4.25: Schmelzkurvendarstellung der NT- Rezeptoren trkC und trkB(gp 95) aus den B-Zellen der Milz und des KMs**

In dieser Abbildung sind die Schmelzkurven der untersuchten Produkte dargestellt. Es zeigen sich hier keine Primerdimere bei niedrigeren Temperaturen. (Für die genaue Beschreibung der Grundlagen dieser Abbildungsart siehe bitte Abb. 4.18, Kap. 3.5.5.1 und Abb. 3.16)

#### 4.3.4 Zusammenfassung der Ergebnisse

1. Die durchflußzytometrische Analyse des KM ergab, dass sich die B-Zellen in einem Milieu aus erythroiden und granulozytären Vorläuferzellen sowie pluripotenten Stammzellen befinden.
2. In der Milz ergaben die durchflußzytometrischen Untersuchungen eine dominierende Repräsentanz der lymphoiden Reihe sowie ein großer Anteil an Makrophagen.
3. Die Zellen des ZNS von C57BL/6 exprimieren alle in dieser Arbeit untersuchten NTs und NT-Rezeptoren.
4. Die qualitative PCR-Analyse zeigt, dass die B-Zellen des KM und der Milz die untersuchten NT-Rezeptoren (trkA, trkB (gp95), trkC, p75<sup>NTR</sup>) und die NTs (BDNF, NGF, NT-3) exprimieren.
5. Der NT-Rezeptor trkB (gp145) wird von B-Zellen des KM und der Milz nicht exprimiert.
6. Die quantitative PCR-Analyse zeigt, dass die Zellen des ZNS die NTs und NT-Rezeptoren in unterschiedlicher Häufigkeit exprimieren: trkC > trkB (gp95) > BDNF > NT-3 > NGF.
7. Für die B-Zellen der Milz lässt sich eine Reihenfolge abnehmender Expression der untersuchten NTs aufzeigen: NT-3 > NGF > BDNF.
8. Die B-Zellen des KM exprimieren die untersuchten NTs in folgender Reihenfolge: NT-3 > BDNF > NGF.
9. Im Vergleich der Expression der NTs zwischen den B-Zellen des KM und der Milz exprimieren B-Zellen des KM mehr BDNF als die B-Zellen der Milz.
10. Die B-Zellen der Milz exprimieren mehr NGF und NT-3 als die B-Zellen des KM.
11. B-Zellen aus dem KM und der Milz exprimieren mehr trkC als trkB (gp95).
12. Die B-Zellen des KM enthalten mehr genetische Information für den NT-Rezeptor trkC als die B-Zellen der Milz.
13. Eine eindeutige Differenz der Expressionshäufigkeit von trkB (gp95) zwischen den B-Zellen von Milz und KM lässt sich nicht aufweisen.

## 5. Diskussion

Die vorliegende Arbeit gliedert sich im Hinblick auf die durchgeführte Methodik in zwei Abschnitte. Der erstere untersucht mittels zellbiologischer Methoden die zelluläre Zusammensetzung von Knochenmark und Milz.

Im zweiten Abschnitt beschäftigt sich diese Arbeit mit der differentiellen Expression von Neurotrophin- Rezeptoren und Neurotrophinen in murinen B-Zellen unter Berücksichtigung des jeweiligen Zellmilieus und vergleicht diese miteinander. Hierbei wird der Frage nach Unterschieden in der Expression einzelner Neurotrophin- Rezeptoren und Neurotrophinen Beachtung geschenkt.

### 5.1 Das zelluläre Milieu im KM und der Milz

In dieser Arbeit wurden das jeweilige umgebende zelluläre Milieu von Milz und KM mittels spezifischer zellulärer Marker in fluoreszenzzytometrischer Methoden untersucht (*siehe 4.1.3.1 und 4.1.3.2*).

Die jeweiligen Kompartimente unterscheiden sich dahingehend, dass sich die B-Zellen im KM in unterschiedlichen Entwicklungsstufen (*Melchers and Rolink 1999; Hardy et al. 2001*) und in einem Milieu aus Vorläuferzellen der erythroiden und granulocytären Reihe, pluripotente Stammzellen sowie einem Pool aus zahlreichen Zytokine befinden (*Kincade et al. 1994*) (*siehe Abb. 4.7*). Hier ist insbesondere IL-7 zu nennen, einen notwendigen Faktor für die regelrechte Entwicklung und Differenzierung der B-Zelle in den frühesten Stadien (ab Prä-Pro-B-Zell- Stadium), welcher über den IL-7-Rezeptor (CD 127) der B-Zelle vermittelt wird (*Namen A.E. et al. 1988*). Die IL-7- Synthese erfolgt durch die Stromazellen des KM (*Mertsching E. et al. 1996; Ceredig R. et al. 1998; Labouyrie et al. 1999*).

Der Großteil der Zellen im KM besteht aus Zellen und deren Vorläufern der erythroiden (ca. 30%) und granulocytyären und monozytären Reihe (ca. 50 – 60%) (*Hagmann et al. 2001*) (*siehe Abb. 4.7, Kap. 4.1.3.1*).

In der Milz dagegen zeigt sich in den durchflußzytometrischen Analysen ein Überwiegen der lymphoiden Reihe, repräsentiert durch reife B- und T-Zellen (*siehe Abb. 4.9*) sowie ein großer Anteil von Makrophagen. Hier ist der Ort des Antigen-Kontaktes und der Interaktion mit T-Zellen und Makrophagen.

Mittels CD45R(B220)- Pan- B-Zell- Marker wurden die Populationen an B-Zellen im KM und in der Milz bestimmt (*siehe Kap. 4.1.3.1 und 4.1.3.2*). Dieser B-Zell- Marker wird von allen B-Zellen in den unterschiedlichen Entwicklungsstufen exprimiert (*Johnson P. et al. 1997*).

Eine genauere Analyse der verschiedenen Subpopulationen der B-Zellen im KM und der Milz erfolgte in dieser Arbeit nicht, da zum damaligen Zeitpunkt der experimentellen Phase dieser Arbeit neben MACS (Magnetic Activated Cell Sorting) (*siehe Kap. 4.1.2*) keine spezifischeren Methoden zur genaueren Differenzierung von B-Lymphozyten-Subpopulationen und andere Verfahren zur Separation dieser Subpopulationen nicht zur Verfügung standen.

Nach den Veröffentlichungen von Rolink und Melchers 1999 und Hardy et al. 2001 setzen sich die B-Zell-Subpopulationen im KM aus den Vorläufer-B-Zellen (Prä-Pro-B-Zelle bis unreife B-Zelle) und in der Milz aus überwiegend reifen - und zum Teil - unreifen B-Zellen (ca. 5 – 10%) (*Melchers et al. 1999*) zusammen. Dahingehend setzen wir nach diesen Quellen voraus, dass es sich bei den mittels CD45R(B220) detektierten B-Zellen aus der Milz um überwiegend reife B-Zellen (> 90%) und bei den Zellen im KM um ausschließlich unreife Vorstadien der B-Zelle ohne Vorliegen von reifen B-Zellen handelt.

Die verwendeten Zuchttiere – 17 Tage alte Wildtyp- Mäuse C57BL/6 - wurden nach dem im Kap. 3.1.1 und 3.1.2 aufgeführten Aufzuchtprotokollen behandelt und versorgt, um einen Antigenkontakt weitestgehend zu verhindern. Ziel ist die Untersuchung ist die genauere Analyse der B-Zellen ohne Einfluß von viral- bzw. infektiöser oder maligner (z.B. B-Zell-Lymphom) Transformationen.



## 5.2 Expression von Neurotrophinen und Neurotrophin-Rezeptoren der murinen B-Zellen

In einem ersten Schritt der molekulargenetischen Analysen wurde mittels einer qualitativen PCR (*siehe Kap. 4.2*) näher untersucht, welche Neurotrophine und Neurotrophin- Rezeptoren in B-Zellen des KM und der Milz sich nachweisen lassen. In dieser Arbeit konnte nachgewiesen werden, dass alle in dieser Arbeit untersuchten Neurotrophine (NGF, BDNF, NT-3) und alle Neurotrophin- Rezeptoren (trkBgp95, trkC und trkA, p75<sup>NTR</sup>) exprimiert werden mit Ausnahme des trkBgp145 (*siehe Kap. 4.2.5*). Zu Beginn wurde trkBgp145 ausschließlich auf neuronalen Gewebe nachgewiesen (*Biffo et al. 1995*). Nun zeigen ausgedehnte histologische und molekularbiologische Untersuchungen an stimulierten bzw. EBV-transformierten sowie maligner (Non- Hodgkin-) B-Zellen (*Labouryie et al. 1997; D'Onofrio et al. 2000; Schenone et al. 1996; Nakagawara et al. 2001*) eine nachweisliche extraneuronale Expression des trkBgp145- Rezeptors, bestreiten jedoch teilweise die Existenz von p75<sup>NTR</sup> auf B-Zellen (*D'Onofrio et al. 2000*). Andere Autoren zeigen lediglich nur die Expression von trkA und p75<sup>NTR</sup> auf Gedächtnis- B-Zellen (*Torcia et al. 1996*).

Anscheinend führt die maligne bzw. die viral bedingte Transformation der B-Zellen im Rahmen einer EBV- Infektion bzw. einer Non-Hodgkin- Erkrankung der B-Zelle zu einer Aktivierung der trkBgp145- Rezeptor- Expression, was letztendlich auch eine Erklärung für ein anderes Verhalten der B-Zelle sein kann.

Im Rahmen dieser Arbeit konnte weder mittels qualitativer noch mit quantitativer molekularbiologischer Methodik trkBgp145- Rezeptor auf B-Zellen des KM oder der Milz nachgewiesen werden. Jedoch konnte auf den B-Zellen des KM und der Milz ein ca. 95kDa großes trkB-Molekül (trkBgp95) ohne Tyrosinkinase-Domäne, also ohne intakten katalytischen Zentrum (*Klein et al. 1989/ 1990; Middlemas et al. 1991*) nachgewiesen werden.

Ursprünglich ging man davon aus, dass diese „beschnittene“ Form von den üblichen Signalwegen ausgeschlossen ist (*Barbacid et al. 1995; Kaplan et al. 1993*). Es wurden verschiedene Funktionen für diese Rezeptorform diskutiert: Inhibition der Neurotrophin- Signalwege (*Eide et al. 1996*) durch

Dimerisierung mit trkBgp145, ein unabhängiger intrazellulärer Signalweg (*Baxter et al. 1997*), eine BDNF induzierte Signalkaskade – nachgewiesen in cerebralen Glia- Zellen - (*Rose et al. 2003*) oder eine Interaktionen mit  $p75^{\text{NTR}}$  (*Hapner et al. 1998; Hartmann et al. 2004*).

Da wir in dieser Arbeit neben trkBgp95- Rezeptor auch den Pan-Neurotrophin- Rezeptor  $p75^{\text{NTR}}$  auf B-Zellen des KM und der Milz nachweisen konnten, könnte über eine Interaktion von trkBgp95 und  $p75^{\text{NTR}}$  ein Effekt des natürlichen Liganden von trkBgp95 – BDNF - auf die B-Zelle erklärt werden (*siehe Abb. 1.9 und 1.12*).

$P75^{\text{NTR}}$  wird einerseits über eigene, trk- unabhängige, Signaltransduktions-Mechanismen eine Modulation der Neurotrophinwirkung in der Zielzelle (*Dobrowsky et al. 1994*) und andererseits ein Effekt durch Komplexbildung mit den trk- Rezeptoren (*Barrett et al. 1999; Chao et al. 1998*) zugeschrieben. Dies erklärt die unterschiedlichen Effekte - Apoptose und Überleben - des  $p75^{\text{NTR}}$  auf die jeweilige Zielzelle (*Verdi et al. 1994; Barker et al. 1994*).

Dabei scheint es unterschiedliche Interaktionen mit den trk- Rezeptoren zu geben. In den verschiedenen Modellen zur Interaktion wird eine Komplexbildung zu Oligomeren, zu Heterodimeren (*Jing et al. 1992*) und ein Rekrutierungsmodell (*Chao et al. 1995*) diskutiert (*siehe Abb. 1.9*).

Diese antiapoptotische und proliferative Kaskade wird nur bei Vorliegen von trk- Rezeptoren in Gang gesetzt (*Cotrino et al. 2000*). In der Abwesenheit von trk- Rezeptoren werden nach einer Neurotrophinbindung apoptotische Signale intrazellulär vermittelt (*Chao et al. 1998*). (*siehe Abb. 1.12*).

Der Nachweis beider Rezeptoren lässt positive Effekte von BDNF auf B-Zellen über die oben aufgeführten Modelle erklärbar werden. Funktionelle Untersuchungen zur genaueren Analyse dieses Postulates erfolgten in dieser Arbeit nicht. Der Nachweis beider Rezeptoren auf der murinen B-Zelle im KM und der Milz macht eine Reaktion auf BDNF ohne Vorliegen des trkBgp145 unter Berücksichtigung der oben genannten Modelle möglich. Dadurch sind autokrine Funktionen von BDNF in den B-Zellen selbst denkbar, die schon für die Mastzellen im Respirationstrakt beschrieben wurden (*Kanda et al. 2002; Skaper et al. 2000; Xiang et al. 2000*). Im humanen KM wurden

ebenfalls autokrine und parakrine Mechanismen angenommen (*Labouryie et al. 1999*).

Des Weiteren wurden - wie schon erwähnt - die trk-Rezeptoren trkA, trkC sowie die Neurotrophine NGF, BDNF und NT-3 in den B-Zellen des KM und der Milz nachgewiesen. Eine semiquantitative Analyse mittels Messung der Fluoreszenzintensität (GelScan® V5.01) erbrachte keine Differenz zwischen den Expressionsmuster und der Expressionsintensität zwischen den einzelnen Neurotrophin- Rezeptoren und Neurotrophinen auf den B-Zellen des KM und der Milz. Dies ist zudem durch die Limitierung der Methodik der qualitativen PCR bedingt wie die unterschiedliche Produktgröße (in bp) durch die verwendeten Primer (*siehe Tab. 4.2*), die somit in unterschiedlichen Ausmaß Ethidiumbromid einlagern und somit per se eine differente Fluoreszenzstärke aufweisen. Aus diesem Grunde zogen wir eine quantitative molekularbiologische Methoden (LightCycler®) hinzu, um die Fragen nach unterschiedlichen Expression von Neurotrophinen und deren Rezeptoren auf den B-Zellen des KM und der Milz einhergehend zu klären.

### 5.3 Different Expression von Neurotrophin- Rezeptoren und Neurotrophinen in murinen B-Zellen des KM und der Milz

Im Kapitel 3.5.5.1 – 3.5.5.3 wird die genaue Methodik einhergehend erklärt. Mittels dieser Methodik wird der jeweiligen Schwellenzyklus  $C_T$  für das zu untersuchende Target (Neurotrophin/ Neurotrophin-Rezeptor) ermittelt und miteinander verglichen. Dieser Vergleich lässt einen Rückschluß auf den unterschiedlichen mRNA-Gehalt des jeweiligen Neurotrophin bzw. Neurotrophin-Rezeptors zu und macht diese untereinander vergleichbar.

Aus den Untersuchungen der Neurotrophine (NGF, BDNF, NT-3) ergibt sich für die Kompartimente KM und Milz folgende Ergebnisse (*vgl. Kap. 4.3.2 und 4.3.3*):

- ◆ In den CD45R(B220) positiven B-Zellen – zu über 90% reife B-Zellen – ist NT-3 das dominante Neurotrophin, gefolgt von NGF und danach BDNF (*siehe Tab. 4.4*).

- ◆ In den CD45R(B220) positiven B-Zellen des KM – fast ausschließlich unreife B-Zellen und deren Vorläuferstadien – ist das dominante Neurotrophin ebenfalls NT-3, jedoch gefolgt von BDNF und letztendlich NGF (*siehe Tab. 4.4*).
- ◆ Im Vergleich der beiden Kompartimente – unreife B-Zellen mit deren Vorläufern des KM mit reifen B-Zellen aus der Milz – zeigt sich, dass in den CD45R(B220) positiven Zellen des KM mehr BDNF enthalten ist als in den Zellen der Milz (*siehe Tab. 4.5*). In den CD45R(B220) positiven reifen B-Zellen der Milz ist zu einem geringen Unterschied mehr NT-3 und NGF enthalten.

Die Relevanz der Unterschiede in der Expression von Neurotrophinen durch die B-Zellen der unterschiedlichen Kompartimente ist nicht gänzlich klar. Durch die unreifen B-Zellen des KM und deren Vorläufern wird mehr BDNF exprimiert als durch die reifen B-Zellen der Milz. In aktuellen Untersuchungen mittels eines BDNF-knock-out- Mausmodells konnte gezeigt werden, dass die Abwesenheit von BDNF zu einem spezifischen Defekt in der regelrechten B-Zell- Lymphopoese mit einem Entwicklungstop in den frühen B-Zell-Stadien führte (*Schuhmann et al. 2005*). Dies könnte die Erklärung für die erhöhte Expression von BDNF in den unreifen B-Zellen des KM sein.

Der erhöhte Level von NGF in den reifen B-Zellen der Milz ist erklärbar durch die bereits beschriebene Funktion von NGF vor allem auf die Gedächtnis-B-Zellen als autokriner Überlebensfaktor (*Torcia et al. 1996*). Zudem konnte gezeigt werden, dass NGF ein wesentlicher Faktor für die Ig-Synthese (*Kimata et al. 1991*) und die regelrechte Proliferation peripherer B-Lymphozyten (*Thorpe et al. 1987*) sowie Differenzierung (*Otten et al. 1989*) darstellt. Auch im Rahmen neuroimmunmodulatorischer Prozesse ist NGF ein wesentlicher Faktor (*Otten et al. 1994*), so dass auch hier der erhöhte Level an NGF in den reifen B-Zellen der Peripherie mit autokriner und parokriner Funktion auf andere interagierenden Zellen erklärbar erscheint.

NT-3 wurde schon im Vorfeld als notwendiger Faktor zur Differenzierung und Proliferation von Immunzellen beschrieben (*Besser et al. 1999; Torcia et al. 1996*). Der detektierte Unterschied in der Expression von NT-3 – reife CD45R(B220) positive B-Zellen in der Milz exprimieren mehr NT-3 als die unreifen B-Zellen des KM – ist aktuell nicht klar. Als hypothetische Erklärung könnten synergistische Effekte mit NGF auf die regelrechte Proliferation und Immunantwort bestehen, da gezeigt werden konnte, dass NT-3 in höheren Level ebenfalls an den trkA- Rezeptor bindet wie NGF (*Klein et al. 1991; Glass et al. 1993; Barbacid et al. 1994/ 1993*) und dabei dieselben Effekte an den Zellen auslöst. Ebenfalls ist nicht ausreichend geklärt, warum die B-Zellen beider Kompartimente NT-3 in höheren Level exprimieren als die jeweiligen anderen Neurotrophinen. Dahingehend wäre eine genauere Untersuchung der Rolle von NT-3 in der B-Zell-Lymphopoese sinnvoll.

Hinsichtlich der Neurotrophine-Rezeptoren ließen sich mittels der quantitativen PCR-Methodik nur zwei Rezeptoren (trkBgp95 und trkC) etablieren. Es gelang in dieser Arbeit zwar der qualitative Nachweis von trkA und p75<sup>NTR</sup>, die quantitative Analyse erbrachte jedoch keine validen reproduzierbaren Ergebnisse, so dass wir uns in dieser Arbeit nur auf die validen und reproduzierbaren Daten des quantitativen Nachweises von trkBgp95 und trkC beschränken. Folgende Ergebnisse lassen sich aufzeigen:

- ◆ Es zeigt sich in beiden Kompartimenten auf den reifen wie unreifen CD45R(B220) positiven B-Zellen eine dominante Expression des Neurotrophin-Rezeptors trkC gegenüber trkBgp95 *siehe Tab. 4.6*).
- ◆ Im Vergleich der B-Zellen aus der Milz und des KM zeigt sich, dass CD45R(B220) positive B-Zellen aus dem KM enthalten geringfügig mehr genetische Information an trkC *(siehe Tab. 4.7)*.
- ◆ Reife B-Zellen der Milz enthalten geringfügig mehr mRNA für den Rezeptor trkBgp95 als unreife B-Zellen des KM *(siehe Tab. 4.7)*. Dieser Unterschied ist jedoch allenfalls marginal, da noch nicht einmal

eine Differenz von einem Zyklus sich aufzeigen ließ. Insgesamt ist die Expression als gleich anzusehen.

Der erhöhte Expressionslevel der B-Zellen des im KM und der Milz von trkC lässt sich gut durch den ebenfalls in beiden Kompartimenten erhöhten Level an NT-3 erklären.

Wie schon erläutert, wurde in den unreifen B-Zellen der Milz mehr NT-3 nachgewiesen als in den B-Zellen des KM. Für den trkC- Rezeptor scheint dieses Verhältnis umgedreht zu sein: in den B-Zellen des KM ist (geringfügig) mehr genetische Information für trkC enthalten als in den B-Zellen der Milz. Gegenfalls ist dies durch den erhöhten Gehalt an NT-3 in der Milz bedingt im Rahmen einer mutmaßlichen Down- Regulation. Genauere Untersuchungen könnten hier Aufschluß geben.

Als Primer für TrkC wurde ein Primer verwendet, der alle Isoformen des trkC erkennt, somit also auch die trkCgp108-Isoform, die analog zum trkBgp95 kein katalytisches Zentrum besitzt (*Tsoufas et al. 1993; Barbacid et al. 1994*). Auch hier – wie beim trkBgp95 – ist die „beschnittene“ Form des trkC von den üblichen Signalwegen ausgeschlossen (*Barbacid et al. 1995; Kaplan et al. 1993*), Es werden alternative Signalwege (*Baxter et al. 1997*), die Inhibition der klassischen Neurotrophin- Signalwege (*Eide et al. 1996*) oder Interaktionen mit dem Pan-Neurotrophinerezeptor p75<sup>NTR</sup> angenommen (*Hapner et al. 1998*).

Über die trkC- Rezeptoren kann die Wirkung des NT-3 auf die B-Zellen in beiden Kompartimenten vermittelt werden, welche für die Differenzierung und Proliferation der B-Zellen einen Einfluß hat (*Torcia et al. 1996*). trkC wurde im humanen KM gerade für die neutrophile und eosinophile Granulopoese als Bestandteil beschrieben (*Labouyrie et al. 1999*). Zudem scheint es in den Makrophagen und Epithelzellen der Lunge eine Bedeutung im Hinblick auf inflammatorische Prozesse zu haben (*Hikawa et al. 2002*). Des Weiteren wurde im Rahmen der Frakturheilung erhöhte NT-3-Level und vermehrte Expression von trkC-Rezeptoren auf den Osteoblasten im Frakturbereich nachgewiesen (*Nakanishi et al. 1994a/b*), so dass autokrine und parakrine Mechanismen ebenfalls für NT-3 und trkC als sehr wahrscheinlich

angesehen werden, so dass diese auch für die B-Zellen postuliert werden können. Auch hier könnte eine weitere Untersuchung z. Bsp. im Rahmen eines Knock-out- Mausmodells die Bedeutung von *trkC* für die B-Zelle beleuchtet werden.

Der Unterschied in der Expression des *trkBgp95*- Rezeptors in den B-Zellen ist so geringfügig, dass eine relevante Differenz in den wiederholten Untersuchungen nicht beschrieben werden kann. Über die Rolle des *trkBgp95*- Rezeptors wurde im Kapitel 5.2 eingegangen.

## 5.4 Ausblick

Hinsichtlich der Zielstellung dieser Arbeit wurde der Nachweis über die Expression der Neurotrophin- Rezeptoren und Neurotrophine auf murinen B-Zellen in den Kompartimenten KM und der Milz erbracht. Zudem erfolgte die quantitative Differenzierung mittels LightCycler-PCR-Technologie. Welche funktionellen Unterschiede aus diesen Ergebnissen gezogen werden können, müssen weitere Untersuchungen klären.

Zudem erbrachte diese Arbeit im Rahmen der Methodenetablierung der quantitativen PCR mit murinen cerebralen Zellen erstmalig eine quantitative Analyse der Expression von Neurotrophinen und Neurotrophin- Rezeptoren im Gehirn der Maus. Eine genauere Differenzierung zwischen Neuronen und Gliazellen wurde im Rahmen der Methodenetablierung nicht durchgeführt, jedoch könnte eine quantitative Expressionsanalyse der einzelnen cerebralen Zellen im Gehirn der Maus einen genaueren Aufschluß über etwaige neue Funktionen der Neurotrophine und deren Rezeptoren erbringen.

## 6. Zusammenfassung

Neurotrophine sind lösliche Faktoren, die für die Entwicklung und das Überleben des Nervensystems der Wirbeltiere unerlässlich sind (*Barbacid et al. 1994, Lavi-Montalcini et al. 1987*). Sie werden durch die Zielzellen des Nervensystems selbst – im Rahmen von autokrinen Mechanismen – oder durch das umgebende Stroma sezerniert und entfalten ihre Wirkung durch spezifische Rezeptoren (trk- Rezeptoren/ Pan-Neurotrophin- Rezeptor p75<sup>NTR</sup>), die ihrerseits durch verschiedene Signalkaskaden differente Funktionen wie die Induktion der Axonsprossung (*Heumann et al. 1994*), Motoneuron- (*Wiese et al. 1999*), der Gliazellentwicklung (*Barres et al. 1994*), Schutz vor Zytotoxizität (*Lindholm et al. 1993*) und Modulation der Proteinexpression sowie synaptischen Funktion (*Korsching et al. 1993*) jedoch auch Apoptose vermitteln. Ihre Funktion geht über rein trophische Effekte hinaus wie die Induktion von Chemotaxis im Rahmen der Nervenzellentwicklung (*Gundersen et al. 1979*).

Aktuelle Arbeiten und Daten der letzten 10 Jahre belegen darüber hinaus, dass Neurotrophine auch extraneuronal insbesondere durch Zellen des Immunsystems und des Knochenmarks exprimiert werden (*Labouyrie et al. 1999*).

Zudem spielen Neurotrophine eine wichtige Rolle im physiologischen und pathophysiologischen Ablauf der Entwicklung der Immunzellen im KM (*Labouyrie et al. 1999*) und der Lymphozyten in der Peripherie (*Thorpe and Perez-Polo 1987; Otten et al. 1989*) sowie der Immunreaktion des Asthma bronchiale (*Braun et al. 2001; Nockher et al. 2006*) und Tumorerkrankungen wie das B-Zell-Lymphom (*Labouyrie et al. 1997*).

Differenten Angaben bestehen allerdings über die Detektion von Neurotrophenen und deren Rezeptoren den B-Lymphozyten. Während einige Autoren belegen, dass die B-Zelle trkA, trkC sowie beide Isoformen des trkB-Rezeptors (trkBgp145, trkBgp95) exprimiert (*D'Onofrio et al. 2000; Schenone et al. 1996*) sowie NGF, BDNF und NT-3 sezernieren (*Torcia et al. 1996; Besser et al. 1999*), zeigen andere Autoren lediglich eine Expression von trkA und p75<sup>NTR</sup> auf (*Brodie et al. 1996*).



Ziel der Arbeit war die genaue Charakterisierung des Expressionsmusters der Neurotrophin-Rezeptor- Expression sowie Nachweis der Neurotrophin-Produktion auf murinen B-Lymphozyten mittels qualitativer und quantitativer molekularbiologischer Methoden. Zudem wurde nach quantitativen Unterschieden zwischen reifen B-Zellen der Peripherie – exemplarisch in den B-Lymphozyten der Milz – und unreifen B-Zellen des Knochenmarks gesucht.

Es zeigt sich, dass reife wie unreife B-Zellen alle bekannten Neurotrophin-Rezeptoren (trkA, trkBgp95, trkC, p75<sup>NTR</sup>) sowie deren Liganden (NGF, BDNF, NT-3) exprimieren mit Ausnahme des trkBgp145. Die mRNA für diesen Neurotrophin- Rezeptor konnte weder mittels qualitativer noch quantitativer Methodik nachgewiesen werden. Dennoch ist eine trkB-vermittelte Wirkung des natürlichen Liganden BDNF über trkBgp95 – dem im Ggs. zum trkBgp145 das katalytische Zentrum fehlt – möglich (*Baxter et al. 1997; Hapner et al. 1998*). In dieser Arbeit konnte eine umfassende Charakterisierung der Neurotrophin- (Rezeptor-) Expression der murinen B-Zelle verwirklicht werden.

Des weiteren zeigten sich quantitative Unterschiede im Expressionsmuster der einzelnen Neurotrophine und deren Rezeptoren im Vergleich unreifer mit reifer B-Zellen, so dass eine permanente Modulation dieser Expression und damit unterschiedliche Funktionen der einzelnen Neurotrophine im Rahmen der B-Zell-Entwicklung postuliert werden kann. Weitere funktionelle Untersuchungen könnten hier Aufschluß über die einzelnen differenten Funktionen - neben den bereits bekannten - der verschiedenen Neurotrophine erbringen.

## 7. Literaturverzeichnis

1. Aalto K., Korhonen L., Lahdenne P., Pelkonen P., Lindholm D. (2002). "Nerve growth factor in serum of children with systemic lupus erythematosus is correlated with disease activity". *Cytokine* 20: pp. 136 – 139
2. Abbas et al. (2000). *Cellular and Molecular Immunology*, 4. Ausgabe
3. Acheson A., Conover J.C., Fandl J.P., DeChiara T.M., Russell M., Thadani A., (1995). "BDNF autocrine loop in adult sensory neurons prevents cell death". *Nature* 374: pp. 450 – 453
4. Aguado F., Ballabriga J., Pozas E., Ferrer I. (1998). "TrkA immunoreactivity in reactive astrocytes in human neurodegenerative diseases and colchicine-treated rats". *Acta Neuropathol.* 96: pp. 495 – 501
5. Albers K.M., Wright D.E., Davies B.M. (1994). "Over expression of nerve growth factor in epidermis of transgenic mice causes hypertrophy of the peripheral nerve system". *J. Neurosci.* 14: pp. 1422 – 1432
6. Alessi D.R., Saito Y., Campbell D.G., Cohen P., Sithanandam G., Rapp U., Ashworth A. Marshall C.J., Cowley S. (1994). "Identification of the sites in MAP- Kinase Kinase-1 phosphorylated by p75 (Raf-1)". *EMBO J.* 13: pp. 1610 - 1619
7. Allison J.P., Havran W.L., Poenie M., Kimura J., DeGraffenreid L., Ajami S., Duwe G., Weiss A., and Tsien R. (1988). " Expression and function of CD3 on murine Thymocytes". In *T-Cell Report, UCLA Symposia*, 73<sup>rd</sup> Edition, Kappler J., and Davis M., eds. Pp. 33 - 45
8. Allman D.M., Ferguson S.E., and Cango M.P. (1992). "Peripheral B cell maturation. I. Immature peripheral B cells in adults are heat-stable antigen<sup>hi</sup> and exhibit unique signalling characteristics". *J. Immunol.* 149: 2533 – 2540
9. Aloe L. (1988). "The effect of nerve growth factor and its antibody on mast cell in vivo". *J. Immunol.* 144: pp. 1 - 12
10. Asaumi K., Nakanishi T., Asahara H., Inoue H., Takigawa M. (2000). "Expression of Neurotrophins and their receptors (TRK) during fracture healing". *Bone* 6: pp. 625 – 633

11. Auffray I., Chevalier S., Froger J., Izac B., Vainchenker W., Gascan H., Coulombel L. (1996). "Nerve growth factor is involved in the supportive effect by bone marrow-derived stromal cells of the factor dependent human cell line UT-7". *Blood* 88 (5): pp. 1608 - 1618
12. Baldwin A.N., Bitler C.M., Welcher A.A., Shooter E.M. (1992). "Studies on the structure and binding properties of the cystein-rich domain of rat low affinity nerve growth factor receptor (p75<sup>NGFR</sup>)". *Journal of Biological Chemistry* 267: pp. 8352 – 8359
13. Baldwin A.N., Shooter E.M. (1995). "Zone mapping of the binding domain of the rat low affinity nerve growth factor receptor by introduction of novel N-glycosylation sites". *Journal of Biological Chemistry* 270: pp. 4594 - 4602
14. Barbacid M. (1993). "Nerve growth factor: a tale of two receptors". *Oncogene* 8: pp. 2033 - 2042
15. Barbacid M. (1994). "The Trk Family of Neurotrophin Receptors". *Journal of Neurobiology* Vol. 25. No. 11: pp. 1386 – 1403
16. Barbacid M. (1995). "Structural and functional properties of the trk family of neurotrophin receptors". *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 766: pp. 442 – 458
17. Barde Y.A., Edgar D., Thoenen H. (1982). "Purification of a new neurotrophic factor from mammalian brain". *EMBO J.* 1: pp. 549 - 553
18. Barde Y.A., Davies A.M., Johnson J.E., Lindsay R.M., Thoenen H. (1987). "Brain derived neurotrophic factor". *Prog. Brain Res.* 71: pp. 185 – 189
19. Barker P.A., Shooter E.M. (1994). "Disruption of NGF binding to the low affinity neurotrophin receptor p75<sup>NTR</sup> reduces NGF binding to trkA on PC12 cells". *Neuron* 13: pp. 203 – 215
20. Barnes P.J. (1996). "Neuroeffector mechanism: The interface between inflammation and neuronal responses". *J. Allergy Clin. Immunol.* 98: pp. 73 – 81
21. Barnes P.J. (2001). "Neurogenic inflammation in the airways". *Respir. Physiol.* 125: pp. 145 – 154

22. Barres B.A., Raff M.C., Gaese F., Bartke I., Dechant G., Barde Y.-A. (1994). "A crucial role for Neurotrophin-3 in Oligodendrocyte Development". *Nature* 367: pp. 371 – 375
23. Barrett G.L. (1999). "The p75 neurotrophin receptor and neuronal apoptosis". *Progress in Neurobiology* 61 (2000): pp. 205 – 229
24. Basu T., Wame P.H., Downward J. (1994). "Role of Shc in the activation of Ras in response to epidermal growth factor and nerve growth factor". *Oncogene* 9: pp. 3483 - 3491
25. Baumhueter S., Singer M.S., Henzel W., Hemmerich S., Renz M., Rosen S.D., and Lasky L.A. (1993). „Binding of L-selectine to the vascular sialomucin CD34". *Science* 262: 436 – 438
26. Baxter G.T., Radeke M.J., Kuo R.C., Makrides V., Hinkle B., Hoang R., Medina-Selby A., Coit D., Valenzuela P., Feinstein S.C. (1997). "Signal transduction mediated by the truncated trkB receptor isoforms, trkB.T1 and trkB.T2". *J. Neurosci.* 17 (8): pp. 2683 – 2690
27. Baxter R.M., Cohen P., Obermeier A., Ullrich A., Downes C.P., Doza Y.N. (1995). "Phosphotyrosine residues in the nerve-growth-factor receptor (TrkA). Their role in the activation of inositolphospholipid metabolism and protein kinase cascades in pheochromocytoma (PC12) cells". *Eur. J. Biochem.* 234: pp. 84 - 91
28. Becker A., Reith A., Napiwotzki J., and Kadenbach G. (1996). „A quantitative method of determining initial amounts of DNA by polymerase chain reaction cycle titration using digital imaging and a novel DNA stain." *Anal. Biochem.* 237: 204 - 207
29. Becton Dickinson Immunocytometry Systems, (1998). „Trainingshandbuch: Durchflußzytometrie“, BD Biosciences Europe, Kapitel 1, pp. 2 – 16
30. Becton Dickinson Pharmingen Int. (2000) "Fluorescein Isothiocyanate (FITC)-conjugated rat Anti-Mouse CD19 monoclonal Antibody." BD Biosciences, Pharmingen Technical Data Sheet, pp. 1 -2
31. Becton Dickinson Pharmingen Int. (2000) "Fluorescein Isothiocyanate (FITC)-conjugated rat Anti-Mouse CD3e monoclonal Antibody." BD Biosciences, Pharmingen Technical Data Sheet, pp. 1 -2

32. Becton Dickinson Pharmingen Int. (2000) "R-Phycoerythrin (R-PE)-conjugated rat Anti-Mouse CD3e monoclonal Antibody." BD Biosciences, Pharmingen Technical Data Sheet, pp. 1 -2
33. Becton Dickinson Pharmingen Int. (2001) "Fluorescein Isothiocyanate (FITC)-conjugated rat Anti-Mouse CD34 monoclonal Antibody." BD Biosciences, Pharmingen Technical Data Sheet, pp. 1 -2
34. Becton Dickinson Pharmingen Int. (2000) "R-Phycoerythrin (R-PE)-conjugated rat Anti-Mouse CD135 (Flk-2/Flt3, Ly-72) monoclonal Antibody." BD Biosciences, Pharmingen Technical Data Sheet, pp. 1 -2
35. Becton Dickinson Pharmingen Int. (2000) "R-Phycoerythrin (R-PE)-conjugated rat Anti-Mouse CD45 (Leukocyte common antigen, Ly-5) monoclonal Antibody." BD Biosciences, Pharmingen Technical Data Sheet, pp. 1 -2
36. Becton Dickinson Pharmingen Int. (1998) "Fluorescein Isothiocyanate (FITC)-conjugated rat Anti-Mouse CD45R/B220 monoclonal Antibody." BD Biosciences, Pharmingen Technical Data Sheet, pp. 1 -2
37. Becton Dickinson Pharmingen Int. (1998) "R-Phycoerythrin (R-PE)-conjugated rat Anti-Mouse CD45R/B220 monoclonal Antibody." BD Biosciences, Pharmingen Technical Data Sheet, pp. 1 -2
38. Becton Dickinson Pharmingen Int. (2000) "Fluorescein Isothiocyanate (FITC)-conjugated rat IgG<sub>2b</sub>, $\kappa$  monoclonal Immunoglobulin Isotype Standard." BD Biosciences, Pharmingen Technical Data Sheet, pp. 1 -2
39. Becton Dickinson Pharmingen Int. (1999) "R-Phycoerythrin (R-PE)-conjugated rat IgG<sub>1</sub>, $\kappa$  monoclonal Immunoglobulin Isotype Standard." BD Biosciences, Pharmingen Technical Data Sheet, pp. 1 -2
40. Becton Dickinson Pharmingen Int. (2001) "Fluorescein Isothiocyanate (FITC)-conjugated rat Anti-Mouse Ly-6G (GR-1) and Ly-6C monoclonal Antibody." BD Biosciences, Pharmingen Technical Data Sheet, pp. 1 -2
41. Becton Dickinson Pharmingen Int. (2000) "Fluorescein Isothiocyanate (FITC)-conjugated rat Anti-Mouse MAC-3 monoclonal Antibody." BD Biosciences, Pharmingen Technical Data Sheet, pp. 1 -2

42. Becton Dickinson Pharmingen Int. (2000) "Fluorescein Isothiocyanate (FITC)-conjugated rat Anti-Mouse Pan-NK Cells monoclonal Antibody." BD Biosciences, Pharmingen Technical Data Sheet, pp. 1 -2
43. Becton Dickinson Pharmingen Int. (2000) "R-Phycoerythrin (R-PE)-conjugated rat Anti-Mouse TER-119/ Erythroid Cells (Ly-76) monoclonal Antibody." BD Biosciences, Pharmingen Technical Data Sheet, pp. 1 -2
44. Berkenmeier L., Winslow J., Kaplan D., Nicolics K., Goeddel D., Rosenthal A. (1991). "Neurotrophin-5: A novel neurotrophic factor that activates trk and trkB". *Neuron* 7: pp. 857 – 866
45. Besser M., Wank R. (1999). "Cutting edge: clonally restricted production of the neurotrophins brain-derived neurotrophic factor and neurotrophin-3 mRNA by human immune cells and Th1/Th2- polarized expression of their receptors". *J. Immunol.* 162 (11). Pp. 6303 – 6306
46. Biffo S., Offenhauser N., Carter B.D., Barde Y.A. (1995). "Selective binding and internalisation by truncated receptors restrict the availability of BDNF during development". *Development* 121: pp 2461 - 2470
47. Biozol Diagnostica and Linaris GmbH (2000). "Technically Speaking, Lympholyte®-M M Protocol". Cedarlane Laboratories Ltd., Hornby, Canada, 1 – 4
48. Bischoff S.C., Dahiden C.A., (1992). "Effect of nerve growth factor on the release of inflammatory mediators by mature human basophils". *Blood* 79: pp. 2662 – 2671
49. Boissiere F., Faucheux B., Ruberg M., Hirsch E.C. (1997). "Decrease trkA gene expression in cholinergic neurons of the striatum and basal forebrain of patients with Alzheimer's disease". *Exp. Neurol.* 145: pp. 245 - 252
50. Bonni A., Brunet A., West A.E., Datta S.R., Takasy M.A., Greenberg M.E. (1999). "Cell survival promoted by the Ras-MAPK signaling pathway by transcription-dependent and -independent mechanism". *Science* 286: pp. 1358 - 1362
51. Bothwell M. (1995). "Functional interactions of neurotrophins and neurotrophins receptors". *Annu. Rev. Neurosci.* 18: pp. 223 – 253

52. Boyle M.D., Lawman M.J., Gee A.P., Young M. (1985). "Nerve growth factor: a chemotactic factor of polymorphonuclear leucocytes in vivo". *J. Immunol.* 134: pp. 564 - 568
53. Braun A., Renz H. (2001). "Die Rolle von Neurotrophenen in der Pathogenese des allergischen Asthma bronchiale". *Internist* 42: pp. 1086 – 1095
54. Braun A., Lommatzsch M., Mannsfeldt A., Neuhaus-Steinmetz U., Fischer A., Schnoy N., Lewin G.R., Renz H. (1999). "Cellular sources of enhanced brain-derived neurotrophic factor production in a mouse model of allergic inflammation". *Am. J., Respir. Cell. Mol. Biol.* 21: pp. 537 – 546
55. Brodie C., Gelfand E.W. (1992). "Functional nerve growth factor receptors on human B lymphocytes. Interaction with IL-2". *J. Immunol.* 148: pp. 3492 – 3497
56. Brodie C., Oshiba A., Renz H., Bradley K., Gelfand E.W. (1996). "Nerve growth factor and anti-CD40 provide opposite signals for the production of IgE in interleukin-4-treated lymphocytes". *Eur. J. Immunol.* 26: pp. 171 - 178
57. Bruni A., Bigon E., Boarato E., Mietto L., Leon A., Toffrano G. (1982). "Interaction between nerve growth factor and lysophosphatidylserine on rat peritoneal mast cells". *FEBS Lett.* 138: pp. 190 - 202
58. Bull H.A., Leslie T.A., Chopra S., Dowd P.M. (1998). "Expression of nerve growth factor receptors in cutaneous inflammation". *British J. of Dermatology* 139: pp. 776 – 783
59. Burgi B., Otten U.H., Ochsenberger B., Rihs S., Heese K., Ehrhard P.B., Ibanez C.F., Dahinden C.A. (1996). "Basophil priming by neurotrophic factors. Activation through the trk receptor". *J. Immunol.* 157 (12): pp. 5582 – 5588
60. Caroleo M.C., Costa N., Bracci-Laudiero L., Aloe L. (2001). "Human monocyte/ macrophages activate by exposure to LPS overexpress NGF and NGF receptors". *J. Neuroimmunol.* 113: pp. 193 - 201
61. Carter B.D., Kaltschmidt C., Kaltschmidt B., Offenhauser R., Bohm- Matthaie R., Baeuerle P.A., Barde Y.A. (1996). "Selective Activation of NF-kappa B by

- nerve growth factor through the neurotrophin receptor p75". *Science* 272 (5261): pp. 542 - 545
62. Casaccia-Bonnel P., Carter B.D., Dobrowsky R.T., Chao M.V. (1996). "Death of oligodendrocytes mediated by the interaction of nerve growth factor with its receptor p75". *Nature* 383: pp. 716 – 719
  63. Ceredig R., ten Boekel E., Rolink A., Melchers F., Andersson J. (1998). "Fetal liver organ cultures allow the proliferation expansion of pre-B receptor-expressing pre-B II cells and the differentiation of immature and mature B cells in vitro." *Intl Immunol.* 10: pp. 49 - 59
  64. Chao M.V. (1994). "The p75 neurotrophin receptor". *J. Neurobiol.* 25 (11): 1373 – 1385
  65. Chao M.V., Hempstead B.L. (1995). "p75 and Trk – a two-receptor system". *Trends in Neurosciences* 18: pp. 321 - 326
  66. Chao M.V., Bothwell M. (2002). "Neurotrophins: to cleave or not to cleave". *Neuron* 33: pp. 9 – 12
  67. Chapman B.S. (1995), "A region of the 75 kDa neurotrophin receptor homologous to the death domains of TNFR-I and Fas". *FEBS Lett.* 374: pp. 216 - 220
  68. Chen C., Prak E.L., Weigert M. (1997). "Editing disease-associated autoantibodies". *Immunity* 6: pp. 97 – 105
  69. Chevalier S., Praloran V., Smith C., MacGrogan D., Ip N.Y., Yancopoulos G.D., Brachet P., Pouplard A., Gascan H. (1994). "Expression and functionality of the trkA proto-oncogene product/ NGF receptor in undifferentiated hematopoietic cells". *Blood* 83: pp. 1479 - 1485
  70. Chuang C.F., Ng S.Y. (1994). "Functional divergence of MAP Kinase pathway: ERK 1 and ERK 2 activate specific transcription factors". *FEBS Lett.* 346: pp. 229 - 234
  71. Clary D.O., Weskamp G., Austin L.R., Reichardt L.F. (1994). "trkA cross-linking mimics neuronal responses to nerve growth factor". *Bioessays* 16: pp. 405 – 411



72. Coffman R.L. (1982). "Surface antigen expression and immunoglobulin gene rearrangement during mouse pre-B cell development". *Immunol. Rev.* 69: 5 – 23
73. Coleridge H.M., Coleridge J.C.G. (1994). "Pulmonary reflexes: neural mechanism of pulmonary defence". *Ann. Rev. Physiol.* 56: pp. 69 – 91
74. Connor B., Young D., Lawlor P., Gai W., Waldvogel H., Faull R.L., Dragunow M. (1996). "Trk receptor alterations in Alzheimer disease". *Brain Res. Mol. Brain Res.* 42: pp. 1 – 17
75. Connor B., Dragunow M. (1998). "The role of neuronal growth factors in neurodegenerative disorders of the human brain". *Brain Res. Brain Res. Rev.* 27: pp. 1 - 39.
76. Coppola V., Barrick C.a., Southon E.A., Celeste A., Wang K., Chen B., Haddad el B., Yiin J., Nussenzweig A., Subramaniam A., Tessarollo L. (2004). "Ablation of TrkA function in the immune system causes B cell abnormalities". *Development* 131: pp. 5185 - 5195
77. Cotrina M.L., Gonzalez-Hoyuela M., Barbas J.A., Rodriguez-Tebar A. (2000). "Programmed cell death in the developing somites is promoted by nerve growth factor via its p75(NTR) receptor". *Dev. Biol.* 228: pp. 326 – 336
78. Crutcher K.A., Scott S.A., Liang S., Everson W.V., Weingartner J. (1993). "Detection of NGF-like activity in human brain tissue: increased levels in Alzheimer's disease". *J. Neurosci.* 13: pp. 2540 - 2550
79. Datta S.R., Dudek H., Tao X., Masters S., Fu H., Gotoh Y., Greenberg M.E. (1997). "Akt phosphorylation of BAD couples survival signals to the cell-intrinsic death machinery". *Cell* 91: pp. 231 - 241
80. Davies A.M. (1993). "Neurobiology: Tracking neurotrophin function". *Nature* 368: pp. 193 – 194
81. Dechant G., Rodriguez-Tebar A., Barde Y.A. (1994). "Neurotrophins receptors". *Prog. Neurobiol.* 42: pp. 347 – 352
82. Derijad B., Hibi M., Wu I.H., Barrett H., Su B., Deng T.L., Karin M., Davis R.J. (1994), "Jnk1 – a protein kinase stimulated by UV light and Ha-Ras that

- binds and phosphorylates the C-jun activation domain"., Cell 76: pp. 1025 – 1037
83. De Vries A., Engels F., Henricks P.A., Leusink-Muis T., McGregor G.P., Braun A., Groneberg D.A., Dessing M.C., Nijkamp F.P., Fischer A. (2006). "Airway hyper-responsiveness in allergic asthma in guinea-pigs is mediated by nerve growth factor via the induction of substance P: p potential role for trkA". Clin. Exp. Allergy 36: pp. 1192 – 1200
  84. DiCicco-Bloom E., Friedman W.J., Black I.B. (1993). "NT-3 stimulates sympathetic neuroblast proliferation by promoting precursor survival". Neuron 11: pp. 1101 – 1111
  85. Dobrowsky R.T., Werner M.H., Castellino A.M., Chao M.V., Hannunu Y.A. (1994). "Activation of the sphingomyelin cycle through the low affinity neurotrophin receptor". Science 264: pp. 1024 – 1028
  86. Dobrowsky R.T., Jenkins G.M., Hannun Y.A. (1995). "Neurotrophins induce sphingomyelin hydrolysis. Modulation by co- expression of p75<sup>NTR</sup> with trk receptors". J. Biol. Chemistry 270: pp. 22135 – 22142
  87. D'Onofrio M., de Grazia U., Morrone S., Cuomo L., Spinsanti P., Frati L., Gulino A., Ragona G. (2000). "Expression of neurotrophin receptors in normal and malignant B lymphocytes". Eur. Cytokine Netw. 11: pp. 283 - 291
  88. Ehrhard P.B., Erb P., Graumann U., Otten U. (1993). "Expression of nerve growth factor and nerve growth factor receptor tyrosine kinase Trk in activated CD4-positive T-cell clones". Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90: pp. 10984 - 10988
  89. Ehrhard P., Ganter U., Bauer J. Otten U. (1993). "Expression of functional trk proto-oncogene in human monocytes". Proc. Natl. Acad. Sci. 90: pp. 5423 - 5427
  90. Eide F.F., Vining E.R., Eide B.L., Zang K., Wang X.Y., Reichardt L.F. (1996). "Naturally occurring truncated trkB receptors have dominant inhibitory effects on brain-derived neurotrophic factor signaling". J. Neurosci. 16 (10): pp. 3123 – 3129

91. Emmett C.J., McNeeley P.A., Johnson R.M. (1997). "Evaluation of human astrocytoma and glioblastoma cell lines for nerve growth factor release". *Neurochem. Int* 30: pp. 465 – 474
92. Ernfors P., Ibanez C.F., Ebendal T., Olson L., Persson H. (1990). "Molecular cloning and neurotrophic activities of a protein with structural similarities to nerve growth factor: developmental and topographic expression in the brain". *Proc. Natl. Acad. Sci.* 87: pp. 5454 – 5458
93. Fätkenhauer G., Cornely O., Franzen C., Glück T., Hartmann P., Rubbert A., Salzberger B. (2003). "Infektion bei Immunsuppression in der Hämato-/Onkologie, Transplantationsmedizin und bei HIV". UNI- Verlag AG, 28323 Bremen – London – Boston, pp. 14 – 30
94. Falcini F., Cerinic M., Matucci M., Lombardi A., Generini S., Pignone A., Tirassa P., Ermini M., Lepore L., Partsch G., Aloe L. (1996). "Increased circulation nerve growth factor is directly correlated with disease activity in juvenile chronic arthritis". *Ann. Rheum. Dis.* 55: pp. 745 – 748
95. Feinstein E., Kimchi A., Wallach D., Boldin M., Varfolomeev E. (1995). "The death domain: a module shared by proteins with diverse cellular functions". *Trends in Biochemical Sciences* 20: pp. 342 - 344
96. Fleming T.J., M.L. Fleming and T.R. Malek (1993). "Selective expression of Ly-6G on myeloid lineage cells in mouse bone marrow. RB6-8C5 mAb to granulocyte-differentiation antigen (Gr-1) detects members of the Ly-6G family". *J Immunol.* 151: 2399 - 2408
97. Freeman W.M., Walker S.J., and Vrana K.E. (1999). "Quantitative RT-PCR: pitfalls and potential." *Bio Techniques* 26: 112 – 125
98. Freund V., Pons F., Joly V., Mathieu E., Martinet N., Frossad N. (2002). "Upregulation of nerve growth factor expression by human airway smooth muscle cells in inflammatory conditions". *Eur. Respir. J.* 20: pp. 458 - 463
99. Friedmann W.J., Greene L.A. (1999). "Neurotrophin signaling via trk and p75". *Exp. Cell. Res.* 253 (1): 131 – 142
100. Friedmann W.J. (2000). "Neurotrophins induce death of hippocampal neurons via the p75 receptor". *J. Neurosci.* 20: pp. 6340 – 6346

101. Gage F.H., Wolff J.A., Rosenberg M.B., Xu L., Yee J.K., Shults C., Friedmann T. (1987). "Grafting genetically modified cells to the brain: possibilities for the future". *Neurosci* 23: pp. 795 – 807
102. Gassen H.G., Sachse G.E., Schulte A., Flach R., Kemme M., Lachmund A., Pilarsky Ch., Wientjes F.J. (1994). "PCR: Grundlagen und Anwendungen der Polymerase- Kettenreaktion", Gustav Fischer Verlag, Stuttgart, Jena, New York, pp. 1 – 11, 35 – 57, 97 – 102
103. Galchevagargova Z., Derijard B., Wu I.H., Davis R.J. (1994). „An osmosensing signal transduction pathway in mammalian cells“. *Science* 265: pp. 806 – 808
104. Garcia-Suarez O., Germana A., Hannestad J., Ciriaco E., Laura R., Naves J., Esteban I., Silos-Santiago I., Vega J.A. (2000). „TrkA is necessary for the normal development of the murine thymus“. *J. Neuroimmunol.* 108: pp. 11 – 21
105. Garcia-Suarez O., Blanco-Gelaz M.A., Lopez M.L., Germana A., Cabo R., Diaz-Esnal B., Silos-Santiago I., Ciriaco E., Vega J.A. (2002). „Massive lymphocyte apoptosis in the thymus of functionally deficient TrkB mice“. *J. Neuroimmunol.* 129: pp. 25 - 34
106. Gay D., Saunders T., Camper S., Weigert M. (1993). „Receptor editing: an approach by autoreactive B cells to escape self tolerance“. *J. Exp. Med.* 177: pp. 999 – 1008
107. Gentry J.J., Barker P.A., Carter B.D. (2004). „The p75 neurotrophin receptor: multiple interactors and numerous functions“. *Prog. Brain. Res.* 146: pp. 25 – 39
108. Gentry J.J., Casaccia-Bonnet P., Carter B.D. (2000). „Nerve growth factor activation of nuclear factor kappa B through its p75 receptor is an anti-apoptotic signal in RN22 schwannoma cells“. *J. Biol. Chem.* 275: pp. 7558 - 7565
109. Gibson U.E., Heid C.A., and Williams P.M. (1996). "A novel method for real time quantitative RT-PCR." *Genome Res.* 6: 995 – 1001
110. Gilchrist C.A., Morrison C.F., Chapman K.E., Harman A.J. (1991). "Identification of nerve growth factor-responsive sequences within the

- 5'-region of the bovine preprotachykinin gene". DNA Cell. Biol. 10: pp. 743 – 749
111. Ginty D.D., Bonni A., Greenberg M.E. (1994). "Nerve Growth Factor activates a Ras-dependent protein kinase that stimulates c-fos transcription via phosphorylation of CREB". Cell 77: pp. 713 – 725
  112. Gonzales M., Collins W.F. (1997). "Modulation of motoneuron excitability by brain-derived neurotrophic factor". J. Neurophysiol. 77: pp. 502 – 506
  113. Gotz R., Koster R., Winkler C., Raulf F., Lottspeich F., Scharf M., Thoenen H. (1994). "Neurotrophin-6 is a new member of the nerve growth factor family". Nature 372: pp. 266 – 269
  114. Grills B.L., Schuijers J.A., Ward A.R. (1997). "Topical application of nerve growth factor improves fracture healing in rats". J. Orthop. Res. 15: pp. 235 – 242
  115. Grills B.L., Schuijers J.A. (1998). "Immunohistochemical localization of nerve growth factor in fractured and unfractured rat bone". Acta Orthop. Scand. 69: pp. 415 – 419
  116. Gundersen R.W., Barrett J.N. (1979). "Neuronal chemotaxis: chick dorsal root axons turn toward high concentrations of nerve growth factor". Science 206: pp. 1079 - 1080
  117. Gunn MD, Kyuwa S, Tam C, Kakiuchi T, Matsuzawa A, Williams LT, Nakano H. (1999). „Mice lacking expression of secondary lymphoid organ chemokine have defects in lymphocyte homing and dendritic cell localization“. J Exp Med. 189(3): pp. 451 - 60.
  118. Hagmann F.-G., Kunz C., Wong S. (2001) „Atlas der Hämatologie und Hämatologischen Onkologie.“ Modifiziert nach Prof. Dr. S. Mitrou (Quelle: [www.bildatlas.onkodin.de](http://www.bildatlas.onkodin.de))
  119. Hamada A., Watanabe N., Ohtomo H., Mastuda H. (1996). „Nerve growth factor enhances survival and cytotoxic activity of human eosinophils“. Brit. J. Haematol. 93: pp. 299 - 302
  120. Hannum C., J. Culpepper, D. Campbell, T. McClanahan, S. Zurawski, J.F. Bazan, R. Kastelein, S. Hudak, J. Wagner, J. Mattson, J. Luh, G. Duda, N.

- Martina, D. Peterson, S. Menon, A. Shanafelt, M. Muench, G. Kelner, R. Namikawa, D. Rennick, M.-G. Roncarolo, A. Zlotnik, O. Rosnet, P. Dubreuil, D. Birnbaum, and F. Lee (1994). "Ligand for Flt3/ Flk2 receptor tyrosine kinase regulates growth of haematopoietic stem cells and is encoded by variant RNAs." *Nature* 368: 643 – 648
121. Hantzopoulos P.A., Suri C., Glass D.J., Goldfarb M.P., Yancopoulos Y.A. (1994). "The low affinity receptor p75 can collaborate with each of the trks to potentiate functional responses to the neurotrophins". *Neuron* 13: pp. 187 – 201
  122. Hapner S.J., Boeshore K.L., Large T.H., Lefcort F. (1998). "Neural differentiation promoted by truncated trkC receptors in collaboration with p75(NTR)". *Dev. Biol.* 201: pp. 90 – 100
  123. Hardy R.R., Hayakawa K. (2001). "B Cell Development Pathways". *Annu. Rev. Immunol.* pp. 595 – 621
  124. Hartmann M, Brigadski T, Erdmann K.S., Holtmann B., Sendtner M., Narz F., Lessmann V. (2004). "Truncated TrkB receptor-induced outgrowth of dendritic filopodia involves the p75 neurotrophin receptor." *J. Cell Sci* 117: pp. 5803 - 5814
  125. Hashimoto Y, Matuoka K. Takenawa T., Muroya K., Hattori S., Nakamura S. (1994). "Different interactions of Grb2/Ash molecule with the NGF and EGF receptors in rat Pheochromocytoma PC12 cells". *Oncogene* 9: pp. 869 - 875
  126. Hardy R.R., Carmack C.E., Shinton S.A., Kemp J.D., and Hayakawa H. (1991). "Resolution and characterization of pro-B and pre-pro-B cell stages in normal mouse bone marrow". *J. Exp. Med.* 173: 1213 – 1225
  127. Hardy RR., Hayakawa K. (1995). "B-lineage differentiation stages resolved by multiparameter flow cytometry". *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 764: pp. 19 - 24
  128. Hathcock K.S., Hirano H., Murakami S., and Hodes R.J. (1992). "CD45 expression by B cells. Expression of different CD45 isoforms by subpopulations of activated B cells". *J. Immunol.* 149: 2286 - 2294
  129. Haynes B.F., Hale L.P. (1998) „The human thymus. A chimeric organ comprised of central and peripheral lymphoid components“ *Immunol Res.*18(2): pp. 61 – 78

130. He X.L., Garcia K.C. (2004). „Structure of nerve growth factor complexed with the shared neurotrophin receptor p75“. *Science* 304: pp. 870 – 875
131. Heese K., Hock C., Otten U. (1998). „Inflammatory signals induce neurotrophin expression in human microglial cells“. *J. Neurochem.* 70: pp. 699 – 707
132. Hefti F. (1983). „Is Alzheimer disease caused by lack of nerve growth factor“. *Ann. Neurol.* 13: pp. 109 – 110
133. Hefti F. (1986). „Nerve growth factor promotes survival of septal cholinergic neurons after fimbrial transection“. *J. Neurosci.* 6: pp. 2155 – 2162
134. Hefti F., Weiner W.J. (1986). „Nerve growth factor and Alzheimer’s disease“. *Ann. Neurol.* 20: pp. 275 – 281
135. Hefti F., Schneider L.S. (1991). „Nerve growth factor and Alzheimer’s disease“. *Clin. Neuropharmacol.* 14 Suppl. 1: pp. S62 - 76
136. Heid C.A., Stevens J., Livak K.J., and Williams P.M. (1996). “Real time quantitative PCR.” *Genome Res.* 6: 986 – 994
137. Heumann R. (1994). “Neurotrophin signalling.” *Current opinion in Neurobiology* 4: 668 – 679
138. Hikawa S., Kobayashi H., Hikawa N., Kusakabe T., Hiruma H., Takenaka T., Tomita T., Kawakami T., (2002). “Expression of neurotrophins and their receptors in peripheral lung cells of mice”. *Histochem. Cell. Biol.* 118: pp. 51 – 58
139. Hock C.H., Heese K., Olivieri G., Hulette C.H., Rosenberg C., Nitsch R.M., Otten U. (2000). “Alterations in neurotrophins and neurotrophin receptors in Alzheimer’s disease”. *J. Neural. Transm. Suppl.* 59: pp. 171 – 174
140. Hohn A. Leibrock J., Bailey K., Barde Y.A. (1990). “Identification and characterization of a novel member of the nerve growth factor/ brain-derived neurotrophic factor family”. *Nature* 344: pp. 339 – 341
141. Horne M.C., Roth P.E., DeFranco A.L. (1996). “Assembly of the truncated immunoglobulin heavy chain D  $\mu$  into antigen receptor-like complexes in pre-B cells but not in B cells”. *Immunity* 4 (2): pp. 145 - 158

142. Hummel K.P., Richardson F.L., and Fekete E. (1941). „Biology of the Laboratory Mouse, Jackson Laboratory (2nd Ed.)”. Anatomy, Dover Publications, Inc. New York, 247 – 308
143. Ikuta K., Kina T., MacNeil I., Uchida N., Peault P., Chien Y.-H., and Weissmann I.L. (1990). “A developmental switch in thymic lymphocyte maturation potential occurs at the level of hematopoietic stem cells”. *Cell* 62: 863 - 874
144. Institut der Klinischen Chemie und Molekularen Diagnostik (1999). „Praktikum der Klinischen Chemie und Hämatologie“. Klinikum der Philipps-Universität, Marburg; Seite 44
145. Invitrogen<sup>™</sup> Life Technologies (1999). “Super Script<sup>™</sup> First-Strand Synthesis System for RT-PCR”. Karlsruhe, Version, pp. 2 – 20
146. Ip N.Y., Ibanez C., Nyc S., McClain J., Joones P., Gies D., Belluscio L., Le Beu M., Espinosa M.I., Squinto S., Perrson H., Yancopoulos G. (1992). “Mammalian neurotrophin-4: structure, chromosomal localization, tissue distribution and receptor specificity”. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 89: pp. 3060 - 3064
147. Irwin N., Janssen K.A. (2001). “Molecular Cloning, A Laboratory Manual” 3<sup>rd</sup> Edition, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York, chapter 8, 4 – 24; 86 – 94
148. Janeway C.A., Travers P. (1995). “Immunologie”. Spektrum Akademischer Verlag Heidelberg – Berlin – Oxford
149. Jing S., Tapley P., Barbacid M. (1992). “Nerve growth factor mediates signal transduction through Trk homodimer receptors”. *Neuron* 9: pp. 1067 - 1079
150. Johnson P., Maiti A., and Ng D.H.W. (1997). “CD45: a family of leukocyte-specific cell surface glycoproteins”. In: Weir’s Handbook of Experimental Immunology, Vol. 2. L.A. Herzenberg, D.M. Weir, L.A. Herzenberg, and C. Blackwell, eds. Blackwell Science, Cambridge, MA, pp. 62.1 – 62.16
151. Kanda N., Watanabe S. (2003). „Histamine enhances the production of nerve growth factor in human keratinocytes“. *J. Invest. Dermatol.* 121: pp. 570 – 577



152. Kannan Y., Ushio H., Koyama H., Okada M., Oikawa M., Yashihara T., Kaneko M., Mastuda H. (1991). „2,5S nerve growth factor enhances survival, phagocytosis, and superoxide production of murine neutrophils“. *Blood* 77: pp. 1320 - 1325
153. Kannan Y., Mastuda H., Ushio H., Kawamoto K., Shimada Y. (1993). „Murine granulocyte-macrophage and mast cell colony formation promoted by nerve growth factor“. *Int. Arch. Allergy Immunol.* 102: pp. 362 – 367
154. Kaplan D.R., Miller F.D. (2000). „Neurotrophin signal transduction in the nervous system“. *Curr. Opin. Neurobiology* 10: pp. 381 - 391
155. Kaplan D.R., and Stephens R.M. (1994). „Neurotrphin signal transduction by the Trk receptor.“ *Journal of Neurobiology* Vol. 25, No. 11, pp. 1404 – 1417
156. Kaplan D.R., Matsumoto K., Lucarelli E., Thiele C.J. (1993). “Induction of trkB by retinoid acid mediates biologic responsiveness to BDNF and differentiation of human neuroblastoma cells”. *Neuron* 11: 321 – 331
157. Kaplan D.R., Miller F.D. (2000). “Neurotrophin signal transduction inn the nervous system”. *Curr. Opin. Neurobiol.* 10: pp. 381 – 391
158. Karlsson J.A. (1993). “A role for capsaicin-sensitive, tachykinin containing nerves in chronic coughing and sneezing, but not in asthma: a hypothesis”. *Thorax* 48: pp. 396 – 400
159. Kayser F. H., Bienz K. A., Eckert J., Zinkernagel R. M. (1998), „Medizinische Mikrobiologie; Verstehen – Lernen – Nachschlagen“. Georg Thieme Verlag, Stuttgart, 9. Auflage, 8 – 24; 43 – 131
160. Keller G., Paige C., Gilboa E., Wagner E.F. (1985) „Epression of a foreign gene in myeloid and lymphoid cells derived from multipotent haematopoetic precursors“. *Nature* 318 (6042): pp. 149 - 154
161. Keohavong P., Wang C.C., Cha R.S., and Thilly W.G. (1988). “Enzymatic amplification and characterization of large DNA fragments of genomic DNA” *Gene* 71: 211 – 216
162. Kerscheinstainer M., Gallmeier E., Behrens L., Leal V.V., Misgeld Th., Klinkert W., Kolbeck R., Hoppe E., Oropeza-Wekerle R.-L., Bartke I., Stadelmann Chr., Lassmann H., Wekerle H., Hohlfeld R. (1999). “Activated

- human T cells, B cells, and monocytes produce Brain-derived neurotrophic factor in vitro and in inflammatory brain lesions: a neuroprotective role of inflammatory?”. *J. Exp. Med.* 189: pp. 865 – 870
163. Kimata H., Yoshida A., Ishioka C., Kusonoki T., Hosoi S., Mikawa H. (1991). “Nerve growth factor specifically induces human IgG4 production”. *Eur. J. Immunol.* 21: pp. 137 – 146
  164. Kimata H., Yoshida A., Ishioka C., Mikawa H. (1991). “Stimulation of Ig production and growth of human lymphoblastoid B-cell lines by nerve growth factor”. *Immunology* 72: pp. 451 – 452
  165. Kincade P.W. (1994). “B lymphopoiesis: Global factors, local control”. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, Vol. 91: pp. 2888 – 2889
  166. Klein R., Parada L.F., Coulier F., Barbacid M. (1989). “trkB, a novel tyrosin protein kinase receptor expressed during mouse neural development”. *EMBO J.* 8: pp. 3701 – 3709
  167. Klein R., Conway D., Parada L.F., Barbacid M. (1990). “The trkB tyrosin protein kinase gene codes for a second neurogenic receptor that lacks the catalytic kinase domain”. *Cell* 61: pp. 647 - 656
  168. Klein R., Naduri V., Jing S.A., Lamballe F., Tapley P., Bryant S., Cordon-Cardo C., Jones K.R., Reichardt L.F., Barbacid M. (1991). “ The trkB tyrosine protein kinase is a receptor for brain- derived neurotrophic factor and neurotrophin-3”. *Cell* 66 (2): pp. 395 – 403
  169. Klein R., Lamballe F., Bryant S. Barbacid M. (1992). “The trkB tyrosine kinase is a receptor for neurotrophin-4”. *Neuron* 8. Pp. 947 - 956
  170. Kleppe K., Ohtsuka E., Kleppe R., Molineux J., and Khorana H.G. (1971). “Studies on polynucleotides XCVI. Repair replications of short synthetic DNA's as catalysed by DNA polymerase”. *J. Mol. Biol.* 56: 341 – 361
  171. Kobayashi H., Mizisin A.P. (2001). “Nerve growth factor and neurotrophin-3 promote chemotaxis of mouse macrophages in vitro”. *Neurosci. Lett.* 305: pp. 157 – 160
  172. Koliatsos V.E., Nauta H.J., Clatterbuck R.E., Holtzman D.M., Mobley W.C., Price D.L. (1990). “Mouse nerve growth factor prevents degeneration of

- axotomized basal forebrain cholinergic neurons in the monkey". *J. Neurosci.* 10: pp. 3801 – 3813
173. Kokaia Z., Bengzon J., Metsis M., Kokaia M., Persson H., Lindvall O. (1993). "Coexpression of neurotrophins and their receptors in neurons of the central nervous system". *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90: pp. 6711 – 6715
  174. Kordower J.H., Gash D.M., Bothwell M., Hersh L., Mufson E.J. (1989). "Nerve growth factor receptor and cholinergic acetyltransferase remain colocalized in the nucleus basalis (Ch4) of Alzheimer's patients". *Neurobiol. Aging* 10: pp. 67 – 74
  175. Korsching S. (1993). "The neurotrophic factor concept: a reexamination". *J. Neurosci.* 13: pp. 2739 – 2748
  176. Kossmann T., Hans V., Imhof H.G., Trentz O., Morganti-Kossmann M.C. (1996). "Interleukin-6 released in human cerebrospinal fluid following traumatic brain injury may trigger nerve growth factor production in astrocytes". *Brain Res.* 713: pp. 143 – 152
  177. Krajewska M., Krajewski S., Zapata J.M., Van Arsdale T., Gascoyne R.D., Berern K., McFadden D., Shabaik A., Hugh J., Reynolds A., Clevenger C.V., Reed J.C. (1998). "TRAF-4 expression in epithelial progenitor cells. Analysis in normal adult, fetal, and tumor tissues". *Am. J. Pathology* 152 (2): pp. 1549 - 1561
  178. Krawetz S.A., Pon R.T., and Dixon G.H. (1989). "Increased efficiency of the Taq polymerase catalyzed polymerase chain reaction". *Nucleic Acids Res.* 17: 819
  179. La Sala S., Corinti S., Federici M., Saragovi H.U., Girolomoni G. (2000). "Ligand activation of nerve growth factor receptor trkA protects monocytes from apoptosis". *J. Leukoc. Biol.* 68: pp. 104 - 110
  180. Labouyrie E., Parrens M., de Mascarel A., Bloch B., Merlio J.-P. (1997). "Distribution of NGF receptors in normal and pathologic human lymphoid tissues". *Journal of Neuroimmunology* 77: pp. 161 – 173
  181. Labouyrie E., Dubus P., Groppi A., Nahon F.X., Ferrer J., Parrens M., Reiffers J., de Mascarel A., Merlio J.-P. (1999). "Expression of neurotrophins

- and their receptors in human bone marrow". *Am. J. of Pathology* 154: pp. 405 - 415
182. Lagasse E., and I.L. Weissman (1996). "Flow cytometric identification of murine neutrophils and monocytes". *J. Immunol. Methods* 197: 139 – 150
  183. Lalloo U.G., Fox A.J., Belvisi M.G., Chung K.F., Barnes P.J. (1995). "Capsazepine inhibits cough induced by capsaicin and citric acid but not by hypertonic saline in guinea pigs". *J. Appl. Physiol.* 79: pp. 1082 – 1087
  184. Lamballe F., Klein R., Barbacid M. (1991). "trkC, a new member of the trk family of tyrosine protein kinases is a receptor for neurotrophin-3". *Cell.* 66: pp. 967 – 979
  185. Lamballe F., Klein R., Barbacid M. (1991). "The trk family of oncogenes and neurotrophin receptors". *Princess Takamatsu Symp.* 22: pp. 153 - 170
  186. Lamballe F., Tapley P., Barbacid M. (1993). "trkC encodes multiple neurotrophin-3 receptors with distinct biological properties and substrate specificities". *EMBO J.* 12: pp. 3083 – 3094
  187. Lambiase A., Bracci-Laudiero L., Bonini S., Starace G., D'Elia M.M., DeCarli M., Aloe L. (1997). "Human CD4+ T cell clones produce and release nerve growth factor and express high-affinity nerve growth factor receptor". *J. Allergy Clin. Immunol.* 100: pp. 408 - 414
  188. Lang J., Jackson M., Teyton L., Brunmark A., Kane K., Nemazee D. (1996). "B cells are exquisitely sensitive to central tolerance and receptor editing induced by ultra-low affinity, membrane-bound antigen". *J. Exp. Med.* 184: pp. 1685 – 1697
  189. Laurenzi M., Barabny G., Timmusk T., Lindgren J., Persson H. (1994). "Expression of mRNA encoding neurotrophins and neurotrophin receptors in rat thymus, spleen tissue and immunocompetent cells: Regulation of neurotrophin-4 mRNA expression by mitogens and leukotriene B<sub>4</sub>". *Eur. J. Biochem.* 223: pp. 733 – 741
  190. Lee K.F., Davies A., Jaenisch R. (1994). "p75-deficient embryonic dorsal root sensory and neonatal sympathetic neurons display a decreased sensitivity to NGF". *Development* 120: pp. 1027 - 1033

191. Leibrock J., Lottspeich F., Hohn A., Hofer M., Hengeler B., Masiakowski P., Thoenen H., Barde Y.A. (1989). "Molecular cloning and expression of brain-derived neurotrophic factor". *Nature* 341: pp. 149 - 152
192. Leo O., Foo M., Sachs D.H., Samelson L.E., and Bluestone J.A. (1987). "Identification of a monoclonal antibody specific of a murine T3 polypeptide". *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 84: 1374 – 1378
193. Leslie T.A., Emson P.C., Dowd P.M., Woolf C.J. (1995). "nerve growth factor contributes to the upregulation of growth- associated protein 43 and preprotachykinin A messenger RNAs in primary sensory neurons following peripheral inflammation". *Neuroscience* 67: pp. 753 – 761
194. Levi-Montalcini R. (1987). "The nerve growth factor 35 years later". *Science* 237: pp. 1154 – 1162
195. Levi-Montalcini R., Cohen S. (1956). "IN VITRO AND IN VIVO EFFECTS OF A NERVE GROWTH-STIMULATING AGENT ISOLATED FROM SNAKE VENOM". *Proc Natl Acad Sci U S A*. 42(9): pp. 695 – 699
196. Lewin G.R., Barde Y.A. (1996). „Physiology of the neurotrophins“. *Ann. Rev. Neurosci.* 19: pp. 289 - 317
197. Lindholm D., Dechant G., Heisenberg C.P., Thoenen H. (1993). "Brain-derived neurotrophic factor is a survival factor for cultured cerebellar granule neurons and protects them against glutamate-induced neurotoxicity". *Eur. J. Neurosci.* 5: pp. 1455 – 1464
198. Lindsay R.M., Wiegand S.J., Altar C.a., DiStefano P.S. (1994). "Neurotrophic factors: from molecule to man". *Trends Neurosci.* 17: pp. 182 – 190
199. Lindsay R.M., Harmar A.J. (1989). "Nerve growth factor regulates expression of neuropeptide genes in adult sensory neurons". *Nature* 337: pp. 362 – 364
200. Lochlaey R.M., Killeen N., Lenardo M.J. (2001). "The TNF and TNF receptor superfamilies: integrating mammalian biology". *Cell* 104: pp. 487 – 501
201. Lommatzsch M., Schloetcke K., Klotz J., Schuhbaeck K., Zingler D., Zingler C., Schulte-Herbruggen O., Gill H., Schuff-Werner P., Virchow J.C. (2005). "Brain-derived neurotrophic factor in platelets and airflow limitation in asthma". *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 171: pp. 115 - 120

202. Lyman S.D., James L., Bos T.V., de Vries P., Brasel K., Gliniak B., Hollingsworth L.T., Picha K.S., McKenna H.J., Splett R.R., Fletcher F.A., Maraskovsky E., Farrah T., Foxworthe D., Williams D.E., and Beckmann M.P. (1993). "Molecular cloning of a ligand for flt3/flk2 tyrosine kinase receptor: A proliferative factor for primitive hematopoietic cells." *Cell* 75: 1157 – 1167
203. Madden K.S., Stevens S.Y., Felten D.L., Sundaresan P.R., Livnat S. (2000). "Alterations in T lymphocyte activation following chemical sympathectomy in young and old Fischer 344 rats". *J. Neuroimmunol.* 103: pp. 131 - 145
204. Mahadeo D., Kaplan L., Chao M.V., Hempstead B.L. (1994). "High affinity nerve growth factor binding displays a faster rate of association than p140trk binding. Implications for multi-subunit polypeptide receptors". *Journal of Biological Chemistry* 269: pp. 6884 - 6991
205. Maisonpierre P.C., Belluscio L., Squinto S., Ip N.Y., Furth M.E., Lindsay R.M., D Y.G. (1990). "Neurotrophin-3: A neurotrophic factor related to NGF and BDNF". *Science* 247: pp. 1446 – 1451
206. Marco E.D., Marchisio P.C., Bondanza S. et al. (1991). "Growth-regulated synthesis and secretion of biologically active nerve growth factor by human keratinocytes". *J. Biol. Chem.* 266: pp. 21718 – 21722
207. Marini A.M., Rabins S.J., Lipsky R.H., Mocchetti I. (1998). "Activity-dependent release of brain-derived neurotrophic factor underlies the neuroprotective effect of N-methyl-D-aspartate". *J. Biol. Chem.* 273: pp. 29394 – 29399
208. Martin-Zanca D., Oskam R., Mitra G., Cpoeland T., Barbacid M. (1989). "Molecular and biochemical characterization of the human trk proto-oncogene". *Mol. Cell. Biol.* 9: pp. 24 – 33
209. Matsuda H., Coughlin M.D., Bienenstock J., Denburg J.A. (1988). "Nerve growth factor promotes human hemopoietic colony growth and differentiation". *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85: pp. 6508 – 6516
210. Matsuda H., Switzer J., Coughlin M.D., Bienenstock J., Denburg J.A. (1988). "Human basophilic cell differentiation promoted by 2,5S nerve growth factor". *Int. Arch. Allergy Appl. Immunol.* 86: pp. 453 - 466

211. Matthews W., Jordan C.T., Wiegand G.W., Pardoll D., and Lemischka I.R. (1991) "A receptor tyrosine kinase specific to hematopoietic stem and progenitor cell-enriched populations." *Cell* 65: 1143 – 1152
212. Meakin S.O., Shooter E.M. (1992). "The nerve growth factor family of receptors". *Trends Neurosci.* 15: pp. 323 – 331
213. Meakin S.O., Suter U., Dinrkwater C.C., Welcher A.A., Shooter E.M. (1992). "The rat trk protooncogene product exhibits properties characteristic of the slow nerve growth factor receptor". *Proc. Natl. Acad. Sci.* 89: pp. 2374 - 2378
214. Melchers F., and Rolink A. (1999). "B-Lymphocyte Development and Biology" *Fundamental Immunology*, Fourth Edition, Lippincott-Raven Publishers, Philadelphia, pp. 184 – 224
215. Mertsching E., Grawunder U., Meyer V., Rolink T., Ceredig R. (1996). "Phenotypic and functional analysis of B lymphopoiesis in interleukin-7-transgenic mice: expansion of pro/pre-B cell number and persistence of B lymphocyte development in lymph nodes and spleen". *Eur J Immunol* 26: pp. 28 – 33
216. Metabion GmbH (2002). "DNA- Primer Datasheet for trkA, trkB (gp 95), trkB (gp 145), trkC, p75, NGF, BDNF, NT-3, beta- Aktin, GAPDH." Including oligo sequences of the reverse and forward primer and the expected size of the product. Metabion GmbH, Lena-Christ-Strasse 44, D-82152 Martinsried, Germany
217. Micera A. Vigneti E., Pickholtz D., Reich R., Pappo O., Bonini S., Maquart F.X., Aloe L., Levi-Schaffer F. (2001). "Nerve growth factor displays stimulatory effects on human skin and lung fibroblasts, demonstrating a direct role for this factor in tissue repair". *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 98: pp. 6162 - 6167
218. Middlemas D., Lindberg R.A., Hunter T. (1991). "trkB, a neural receptor protein-tyrosine kinase: evidence for full-length and two truncated receptors". *Mol. Cell. Biol.* 11: pp. 143 - 153

219. Miescher G.C., Schreyer M., and McDonald H.R. (1989). "Production and characterization of a rat monoclonal antibody against the murine CD3 molecular complex". *Immunol. Lett.* 23: 113 – 118
220. Mignini F., Streccioni V., Amenta F. (2003). "Autonomic innervation of immune organs and neuroimmune modulation". *Auton. Autacoid. Pharmacol.* 23: pp. 1 - 25
221. Miltenyi Biotec (2000). "MS Separation Columns plus tubes, Protocol for Cell Separation Using MS Separation Columns and Vario MACS or Super MACS", Miltenyi Biotec Protocol and Data Sheet, 1 – 2
222. Moalem G., Gdalyahu A., Shani Y., Otten U., Lazarovici P., Cohen I.R., Schwartz M. (2000). "Production of neurotrophins by activated T cells: implications for neuroprotective autoimmunity". *J. Autoimmun.* 15: pp. 331 – 345
223. Moore T.A., von Freeden-Jeffrey U., Murray R., and Zlotnik A. (1996). "Inhibition of  $\gamma\delta$  T cell development and early thymocyte maturation in IL-7  $-/-$  mice". *J. Immunol.* 157: 2366 - 2373
224. Morel F., Szilvassy S.J., Travis M., Chen B., and Galy A. (1996). "Primitive hematopoietic cells in murine bone marrow express the CD34 antigen". *Blood* 88: 3774 – 3784
225. Mufson E.J., Li J.M., Sobreviela T., Kordower J.H. (1996). "Decreased trkA gene expression within basal forebrain neurons in Alzheimer's disease". *Neuroreport* 8: pp. 25 – 29
226. Nagatsu T., Mogi M., Ichinose H., Togari A. (2000). "Changes in cytokines and neurotrophins in Parkinson's disease". *J. Neural. Transm. Suppl.* 60: pp. 277 – 290
227. Nakagawara A. (2001). "Trk receptor tyrosine kinases: a bridge between cancer and neural development." *Cancer Lett.* 169: pp. 107 – 114
228. Nakanishi T., Takahashi K., Aoki C., Nishikawa K., Hattori T., Taniguchi S. (1994a). "Expression of nerve growth factor family neurotrophins in a mouse osteoblastic cell line". *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 198: pp. 891 – 987



229. Nakanishi T., Ohyama K., Aoki C., Kudo A., Hattori T., Takahashi K., Taniguchi S., Takigawa M. (1994b). "Expression of trkC in a mouse osteoblastic cell line and response to neurotrophin-3". *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 203: pp. 1268 – 1274
230. Namen A.E., Lupton S., Hjerrild K., Wignall J., Mochizuki D.Y., Schmierer A., Mosley B., March C.J., Urdal D., Gillis S., Cosman D. and Goodwin R.G. (1988). "Stimulation of B-cell progenitors by cloned murine interleukin-7". *Nature (London)* 333: pp. 571 - 573
231. Nilsson A.S., Fainzilber M., Falck P., Ibanez C.F. (1998). "Neurotrophin-7: a novel member of the neurotrophin family from the zebrafish". *FEBS Lett.* 424: pp. 285 - 290
232. Nockher W.A., Renz H. (2006). "Neurotrophins and asthma: novel insight into neuroimmune interaction". *J. Allergy Clin. Immunol.* 117 (1): pp. 67 – 71
233. Noga O., Englmann C., Hanf G., Grutzkau A., Seybold J., Kunkel G. (2003). "The production storage and release of the neurotrophins nerve growth factor, brain-derived neurotrophic factor and neurotrophin-3 by human peripheral eosinophils in allergics and non allergics". *Clin. Exp. Allergy* 33: pp. 649 - 654
234. Obermeier A., Bradshaw R.A., Seedorf K., Choidas A., Schlessinger J., Ullrich A. (1994). "Neuronal differentiation signals are controlled by nerve growth factor receptor/ Trk binding sites for Shc and PLC gamma". *EMBO J.* 13: 1585 – 1590
235. Olgart C., Fossard N. (2001). "Human lung fibroblasts secrete nerve growth factor: effect of inflammatory cytokines and glucocorticoids". *Eur. Respir. J.* 18: pp. 115 - 121
236. Oppenheim R.W. (1991). "Cell death during development of the nervous system". *Annu. Rev. Neurosci.* 14: pp. 453 - 501
237. Ortaldo J.R., Winkler-Pickett R., Mason A.T., and Mason L.H. (1998). "The Ly-49 family: regulation of cytotoxicity and cytokine production in murine CD3<sup>+</sup> cells". *J. Immunol.* 160: 1158 – 1165

238. Osawa M., Hanada K., Hamada H., and Nakauchi H. (1996). "Longterm lymphopoietic reconstitution by a single CD34- low/ negative hemopoietic stem cell". *Science* 273: 242 – 245
239. Osawa M., Tokumoto Y., and H. Nakauchi (1996) " Hemapoietic stemm cells". In Weir's Handbook of Experimental Immunology, Vol. 2, 5<sup>th</sup> Edition. Herzenberg L.A., Weir D.M., Herzenberg L.A., and Blackwell C., eds. Blackwell Science, Cambridge, MA, pp. 66.1 – 66.5
240. Otten U., Goedert M., Mayer N., Lembeck F. (1980). "Requirement of nerve growth factor for development of substance P-containing sensory nerves". *Nature* 287: pp. 158 – 159
241. Otten U., Gadiant R.A. (1995). "Neurotrophins and cytokines – intermediaries between the immune and nervous systems". In. *J. Dev. Neurosci.* 13: pp.147
242. Otten U., Scully J.L., Ehrhard P.B., Gadiant R.A. (1994). "Neurotrophins: signals between the nervous and immune systems". *Prog. Brain Res.* 103: pp. 293 - 305
243. Otten U., Erhard P., Peck R. (1989). "Nerve growth factor induces growth and differentiation of human B lymphocytes". *Proc. Natl. Acad. Sci.* 86: pp. 10056 – 10063
244. Patapoutian A., Reichardt L.F. (2001). "Trk receptors: mediators of neurotrophin action". *Curr. Opin. Neurobiol.* 11: pp. 272 - 280
245. Pawelec G. (1994). „MHC-unrestricted immune surveillance of leukemia“. *Cancer Biother*; 9(3): 265-288
246. Pearce F.L., Thompson H.L. (1986). „Some characteristics of histamine secretion from rat peritoneal mast cells stimulated with nerve growth factor“. *J. Physiol.* 372: pp. 397 - 412
247. PharMingen (2002). „Mouse CD Chart“. PharMingen, A Becton Dickinson Company 10975 Torreyana Road, San Diego, CA 92121
248. Pincelli C., Seignani C., Manfredini R. et al. (1994). „Expression und function of nerve grwoth factor and nerve grwoth factor receptor on cultured keratinocytes“. *J. Invest. Dermatology* 103: pp. 13 - 18

249. Popesko P., Raitovia V., and Horak J. (1990). "A Colour Atlas of Anatomy of Small Laboratory Animals, Vol. 2: Rat, Mouse, Hamster", Wolfe Publishing Ltd., London, 105 – 166
250. Qiagen (1999). "HotStarTaq™ PCR Handbook; HotStarTaq Master Mix", Qiagen GmbH 40724 Hilden, pp. 4 – 15
251. Qiagen (2002). "QuantiTect™ SYBR® Green PCR Handbook; For quantitative, real time PCR and two step RT-PCR", Qiagen GmbH 40724 Hilden, pp. 6 – 34
252. Qiagen (2001). "RNeasy® Mini handbook". Qiagen GmbH 40724 Hilden, pp. 10 – 41
253. Rabizadeh S., Oh J., Zhong L., Yang J., Bitler C.M., Butcher L.L., Bredesen D.E. (1993). "Induction of apoptosis by the low affinity NGF- receptor". Science 261: pp. 345 - 348
254. Radic M.Z., Zouali M. (1996). "Receptor editing, immune diversification, and self tolerance". Immunity 5: pp. 505 – 511
255. Raychaudhuri S.P., Raychaudhuri S.K. (2004). "Role of NGF and neurogenic inflammation in the pathogenesis of psoriasis". Prog. Brain Res. 146: pp. 433 – 437
256. Renz H. (2001). "The role of neurotrophins in bronchial asthma". Eur. J. Pharmacol. 429 (1-3): pp. 231 - 237
257. Riedel K.H., Wingfield B.D., and Britz T.J. (1992). "Combined influence of magnesium concentration and polymerase chain reaction specificity enhancers". FEMS Microbiol. Lett. 92: 69 – 72
258. Ririe K.M., Rasmussen R.P., and Wittwer C.T. (1997). "Product differentiation by analysis of DNA melting curves during the polymerase chain reaction." Anal. Biochem. 245: 154 – 160
259. Roche Diagnostic Cooperation (2000). "LightCycler Operator's Manual" Roche Molecular Biochemicals. Version 3.5, pp. 16 – 19; 97 – 121
260. Roche Diagnostic Cooperation (2004). "[www.roche-applied-science.com/lightcycler-online/](http://www.roche-applied-science.com/lightcycler-online/)." General Information about the LightCycler® system.

261. Rodriguez-Tebar A., Dechant G., Barde Y.A. (1990). "Binding of brain-derived neurotrophic factor to the nerve growth factor receptor". *Neuron* 4: pp. 487 – 492
262. Rodriguez-Viciana P., Warne P.H., Dhand R., Vanhaesebroeck B., Gout I., Fry M.J., Waterfield M.D., Downward J. (1994). "Phosphatidylinositol-3-OH kinase as a direct target of Ras". *Nature* 370: pp. 527 - 532
263. Roit M. Ivan, Brostoff J., Male D.K. (1995). "Kurzes Lehrbuch der Immunologie" Georg Thieme Verlag Stuttgart/ New York, 3. neubearbeitete Auflage, Seite 1 – 11
264. Rolink A., Melchers F. (1993). "B lymphopoiesis in the mouse". *Adv. Immunology* 53: pp. 123 – 156
265. Rolink A., Melchers F. (1996) "B-cell development in the mouse". *Immunology Lett.* 54 (2-3): pp. 157 – 161
266. Rolink A., Karasyama H., Haasner D., et al. (1994). "Two pathways B lymphocyte development in mouse bone marrow and the role of surrogate L chain in this development". *Immunol. Rev.* 137: pp. 185 – 201
267. Rose C.R., Blum R., Pichler B., Lepier A., Kafitz K.W., Konnerth A. (2003). "Truncated TrkB-T1 mediates neurotrophin-evoked calcium signalling in glia cells." *Nature* 426: pp. 74 – 78
268. Rosenthal A., Goeddel D.V., Nguyen T., Lewis M., Shih A., Laramée G.R., Nikolics K., Winslow J.W. (1990). "Primary structure and biological activity of a novel human neurotrophic factor". *Neuron* 4: pp. 767 – 773
269. Rossner S., Ueberham U., Schliebs R., Perez-Polo J.R., Bigl V. (1998). "The regulation of amyloid precursor protein metabolism by cholinergic mechanisms and neurotrophin receptor signalling". *Prog. Neurobiol.* 56: pp. 541 – 569
270. Rubio N. (1997). "Mouse astrocytes store and deliver brain-derived neurotrophic factor using the non-catalytic p75<sup>NTR</sup> receptor". *Eur. J. Neurosci.* 9: pp. 1847 – 1853
271. Sahle A. (2001). "Membrankontakte von T-Lymphozyten mit dendritischen Zellen in den sekundär lymphatischen Organen der Ratte". *Abt. für*

funktionelle und angewandte Anatomie und Institut für Versuchstierkunde der Medizinischen Hochschule Hannover, Hannover, pp. 11 – 20

272. Salehi A., Verhaagen J., Dijkhuizen P.A., Swaab D.F. (1996). "Co-localization of high-affinity neurotrophin receptors in nucleus basalis of Meynert neurons and their differential reduction in Alzheimer's disease". *Neuroscience* 75: pp. 373 – 387
273. Salehi A., Delcroix J.D., Swaab D.F. (2004). "Alzheimer's disease and NGF signalling": *J. Neural. Transm.* 111 (3): pp. 323 - 345
274. Saiki R.K., Gelfand D.H., Stoffel S., Schorf S.J., Higuchi R., Horn G.T., Mullis K.B., and Erlich H.A. (1988). "Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase". *Science* 239: 487 – 491
275. Sawada J., Itakura A., Tanaka A., Furusaka T., Matsuda H. (2000). "Nerve growth factor functions as a chemoattractant for mast cells through both both mitogen-activated protein kinase and phosphatidylinositol 3-kinase signalling pathways". *Blood* 95: pp. 2052 – 2058
276. Schenone A., Gill J.S., Zacharias D.A., Windebank A.J. (1996). "Expression of high- and low-affinity neurotrophin receptors on human transformed B lymphocytes". *J. Neuroimmunol.* 64: pp. 141 - 149
277. Schrezenmeier H., Wiesneth M., Reinhardt P. (2006). "Zelltherapie mit Granulozyten, Lymphozyten und Natürlichen Killerzellen". In *Hämotherapie, Beiträge zur Transfusionstherapie, DRK- Blutspendedienst Baden-Württemberg – Hessen gGmbH*, pp. 4 – 25
278. Schuhmann B, Dietrich A, Sel S, Hahn C, Klingenspor M, Lommatzsch M, Gudermann T, Braun A, Renz H, Nockher WA. (2005). „Role for brain-derived neurotrophic factor in B cell development“. *J Neuroimmunol* 163(1-2): pp. 15 – 23
279. Schuijers J.A., Ward A.R., Grills B.L. (1995). "Nerve growth factor improves fracture healing in rat". *Proc. Austral. Physiol. Pharmacol. Soc.* 26: pp. 98 – 102
280. Schulte-Herbruggen O., Nassenstein C., Lommatzsch M., Qurcoo D., Renz H., Braun A. (2005). "Tumor necrosis factor alpha and interleucine-6 regulate

- secretion of brain-derived neurotrophic factor in human monocytes". J. Neuroimmunol. 160: pp. 204 – 209
281. Scott S.A., Mufson E.J., Weingartner J.A., Skau K.A., Crutcher K.A. (1995). "Nerve growth factor in Alzheimer's disease: increased levels throughout the brain coupled with declines in nucleus basalis". J. Neurosci. 15: pp. 6213 – 6221
  282. Sigma (1998). "Gel Loading Solution – Molecular Biology Reagent." Sigma 3050 Spruce Street Saint Louis, Missouri 63103 USA, page 1
  283. Skaper S.D., Pollock M., Facci L. (2001). "Mast cells differentially express and release active high molecular weight neurotrophins". Brain Res. Mol. Brain. Res. 97: pp. 177 - 185
  284. Smeyne R.J., Klein R., Schnapp A., Long L.K., Bryant S., Lewin A., Lira S.A., Barbacid M. (1994). "Severe sensory and sympathetic neuropathies in mice carrying a disrupted trk/ NGF receptor gene". Nature 368: pp. 246 - 249
  285. Smyth MJ, Hayakawa Y, Takeda K, Yagita H. (2002). „New aspects of natural-killer-cell surveillance and therapy of cancer“. Nat Rev Cance; 2(11): 850-861
  286. Snider W. (1994). „Functions of the neurotrophins during nervous system development: what the knockouts are teaching us“. Cell 10: pp. 137 - 149
  287. Sobue G., Yamamoto M., Doyu M., Li M., Yasuda T., Mitsuma T. (1998). „Expression of mRNA for Neurotrophins (NGF, BDNF, and NT-3) and their receptors (p75NGFR, trk, trkB, and trkC) in human peripheral neuropathies“. Neurochem. Res. 23 (6): pp. 821 - 829
  288. Son YI, Dallal RM, Mailliard RB, Egawa S, Jonak ZL, Lotze MT. (2001). „Interleukin-18 (IL-18) synergizes with IL-2 to enhance cytotoxicity, interferon-gamma production, and expansion of natural killer cells“. Cancer Res; 61(3): 884-888
  289. Squinto S.P., Stitt T.N., Aldrich T.H., Davis S., Bianco S.M., Radziejewski C., Glass D.J., Masiakowski P., Furth M.E., Valenzuela D.M., et al. (1991). „trkB encodes a functional receptor for brain-derived neurotrophic factor and neurotrophin-3 but not nerve growth factor“. Cell 65: pp. 885 - 893

290. Stadelmann Chr., Kerschensteiner M., Misgeld Th., Brück W., Hohlfeld R., Lassmann H. (2002). „BDNF an gp145trkB in multiple sclerosis brain lesions: neuroprotective interactions between immune and neuronal cells?“. *Brain* 125: pp. 75 – 85
291. Stephens R.M., Loeb D.M., Copeland T.D., Pawson T., Greene L.A., Kaplan D.R. (1994). „Trk receptors use redundant signal transduction pathways involving Shc and PLC-gamma 1 to mediate NGF responses“. *Neuron* 12: pp. 691 - 705
292. Storkus WJ, Dawson JR (1991). „Target structures involved in natural killing (NK): characteristics, distribution, and candidate molecules“. *Crit Rev Immunol*; 10(5): 393 – 416
293. Strada O., Hirsch E.C., Javoy-Agid F., Lehericy S., Ruberg M., Hauw J.J., Agid Y. (1992). „Does loss of nerve growth factor receptors precede loss of cholinergic neurons in Alzheimer's disease? An autoradiographic study in the human striatum and basal forebrain“. *J. Neurosci.* 12: pp. 4766 – 4774
294. Stratagene (2001). „RoboCycler® Temperatures Cyclers and Accessories, Instruction Manual“. #70183-00, Stratagene, 11011 North Torrey Pines Road La Jolla, CA 92037, United States, pp. 2 - 31
295. Suggs S.V., Hirose T., Miyake T., Kawashima E.H., Johnson M.J., Itakura K., and Wallace R.B. (1981). „Use of synthetic oligodesoxyribonucleotides for the isolation of specific cloned DNA sequences“. In: *Developmental biology using purified genes* (ed. D.D. Brown), pp. 683 – 693. Academic Press, New York
296. Tam S.Y., Tsai M., Yamaguchi M., Yano K., Butterfield J.H., Galli S.J. (1997). „Expression of functional TrkA receptor tyrosine kinase in HMC-1 human mast cells line and human mast cells“. 90: pp. 1807 - 1820
297. Teichmann JV, Ludwig WD, Thiel E (1992). „Cytotoxicity of interleukin 2-induced lymphokine-activated killer (LAK) cells against human leukemia and augmentation of killing by interferons and tumor necrosis factor“. *Leuk Res* 16(3):287-98
298. Thein S.L. and Wallace R.B. (1986). „The use of synthetic oligonucleotides as specific hybridization probes in the diagnosis of the genetic disorders“. In:

Human genetic disease: A practical Approach (ed. K.E. Davies), pp. 33 – 50.  
IRL Press, Oxford, United Kingdom

299. Thorpe L.W., Perez-Polo J.R. (1987). "The influence of nerve growth factor on the in vitro proliferative response of rat spleen lymphocytes". *J. Neurosci. Res.* 18: pp. 134 – 139
300. Torcia M., Bracci-Laudiero L., Lucibello M., Nencioni L., Labardi D., Rubartelli A., Cizzolino F., Aloe L., Garaci E. (1996). "Nerve growth factor is an autocrine survival factor for memory B lymphocytes". *Cell* 85: pp. 345 - 356
301. Tsoulfas P., Soppet D., Escandon E., Tessarollo L., Mendoza-Ramirez J.L., Rosenthal A., Nikolics K., Parada L.F. (1993). "The rat trkC locus encodes multiple neurogenic receptors that exhibit differential response to neurotrophin-3 in PC-12 cells". *Neuron* 10: pp. 975 – 990
302. Tsuda T., Wong D., Dolovich J., Bienenstock J., Marshall J., Denburg J.A. (1991). "Synergistic effects of nerve growth factor and granulocyte-macrophage colony-stimulating factor on human basophilic cell differentiation". *Blood* 77: pp. 971 – 979
303. Tuszynski M.H., Gage F.H. (1990). "Potential use of neurotrophic agents in the treatment of neurodegenerative disorders". *Acta Neurobiol. Exp. (Wars)* 50: pp. 311 – 322
304. Tuszynski M.H., U H.S., Amaral D.G., Gage F.H. (1990). "Nerve growth factor infusion in the primate brain reduces lesion-induced cholinergic neuronal degeneration". *J. Neurosci.* 10: pp. 3604 – 3614
305. Tuszynski M.H., Sang H., Yoshida K., Gage F.H. (1991). "Recombinant human nerve growth factor iinfusions prevent cholinergic neuronal degeneration in the adult primate brain". *Ann. Neurol.* 30: pp. 625 – 636
306. Uharek L, Zeis M, Glass B, Steinmann J, Dreger P, Gassmann W, Schmitz N, Muller-Ruchholtz W. (1996). „High lytic activity against human leukemia cells after activation of allogeneic NK cells by IL-12 and IL-2“. *Leukemia*; 10: 1758-1764



307. Ultsch M.H., Wiesmann C., Simmons L.C., Henrich J., Yang M., Reilly D., Bass S.H., deVos A.M. (1999). „Crystal structures of the neurotrophin-binding domain of TrkA, TrkB and TrkC“. *J. Mol. Biol.* 290: pp. 149 – 159
308. Urfer R., Tsoulfas P., O'Connell L., Shelton D.L., Parada L.F., Presta L.G. (1995). „An immunoglobulin-like domains determines the specificity of neurotrophin receptors“. *EMBO J.* 14: pp. 2795 - 2805
309. Valenzuela D.M., Maisonpierre P.C., Glass D.J., Rojas E., Nunez L., Kong Y., Gies D.R., Stitt T.N., Ip N.Y., Yancopoulos G.D. (1993). „Alternative forms of rat TrkC with different functional capabilities“. *Neuron* 10: pp. 963 – 974
310. Vega J.A., Garcia-Suarez O., Germana A. (2004). „Vertebrate thymus and the neurotrophin system“. *Int. Rev. Cytol.* 237: pp. 155 - 204
311. Veiby O.P., Jacobsen F.W., Cui L., Lyman S.D., and Jacobsen S.E.W. (1996). „The flt3 ligand promotes the survival of primitive hemopoietic progenitor cells with myeloid as well as B lymphoid potential.“ *J. Immunol.* 157: 2953 - 2960
312. Verdi J.M., Birren S.J., Ibanez C.F., Persson H., Kaplan D.R., Benedetti M., Chao M.V., Snderson D.J. (1994). „p75<sup>LNGRF</sup> regulates trk signal transduction and NGF-induced neuronal differentiation in MAH cells“. *Neuron* 12: pp. 733 – 745
313. Verheij M., Bose R., Lin X.H., Yao B., Jarvis W.D., Grant S., Birrer M.J., Szabo E., Zon L.I., Kyriakis J.M., Haimovitz-Friedman A., Fuks Z., Kolesnick R.N. (1996). „Requirement for ceramide-initiated SAPK/JNK signalling in stress-iinduced apoptosis“. *Nature* 380: pp. 75 – 79
314. Wang Y., Hagel C., Hamel W., Miller S., Kluwe L., Westphal M. (1998). „Trk A, B, and C are commonly expressed in human astrocytes and astrocytic gliomas but not by human oligodendrocytes and oligodendroglioma“. *Acta Neuropathol. Science* 215: pp. 357 – 364
315. Watson A., Ensor E., Symes A. et al. (1995). „A minimal CGRP gene promotor is inducible by nerve growth factor in adult rat dorsal root ganglion neurons but not in PC12 phaeochromocytoma cells“. *Eur. J. Neurosci.* 7: pp. 394 – 400

316. Watson F.L., Porcionatto M.A., Bhattacharyya A., Stiles C.D., Segal R.A. (1999). "TrkA glycosylation regulates receptor localization and activity". *J. Neurobiol.* 39: pp. 323 – 336
317. Weskamp G., Otten U. (1987). "An enzyme-linked immunoassay for nerve growth factor (NGF): a tool for studying regulatory mechanisms involved in NGF production in brain and in peripheral tissues". *J. Neurochem.* 48: pp. 1779 – 1786
318. Wiese St., Metzger F., Holtmann B., Sendtner M. (1999). "The role of p75<sup>NTR</sup> in modulating neurotrophin survival effects in developing motoneurons". *Eur. J. Neurosci.* 11: pp. 1668 – 1676
319. Wiesmann C., deVos A.M. (2001). "Nerve growth factor: structure und function". *Cell. Mol. Life Sci.* 58 (5-6): pp. 748 - 759
320. Winkler T.H., Melchers F., Rolink A. (1994). "Interleukin-3 and interleukin-7 are alternative growth factors for the same B-cell precursors in the mouse". *Blood* 85: pp. 2045 – 2051
321. Winkler T.H., Rolink A., Melchers F., Karasyama H. (1995). "Precursor B cells of mouse bone marrow express two different complexes with the surrogate light chain on the surface". *Eur J Immunol* 24: pp. 446 - 450
322. Winkler T.H., Melchers F. (1997). "Structure und function of the pro- and pre-B cell receptors an B-lymphoid lineage precursor cells". In: Monroe J., Rothenberg E. eds. *Molecular biology of B and T cell development*. Clifton, NJ: Humana Press
323. Wittwer C.T., Herrmann M.G., Moss A.A., and Rasmussen R.P. (1997). "Continuous fluorescence monitoring of rapid cycle DNA amplification" *Bio Techniques* 22: 130 – 138
324. Xiang Z., Nilsson G. (2000). "IgE receptor-mediated release of nerve growth factor by mast cells". *Clin. Exp. Allergy* 30: pp. 1379 - 1386
325. Yan Q., Snider W.D., Pinzone J.J., Johnson E.M. Jr. (1988). "Retrograde transport of nerve growth factor (NGF) in motoneurons of developing rats: assessment of potential neurotrophic effects". *Neuron* 1: pp. 335 – 343

- 326. Yan H., Chao M.V. (1991). "Disruption of cystein-rich repeats of the p75 nerve growth factor receptor leads to loss of ligands binding". *Journal of Biological Chemistry* 266: pp. 12099 – 12104
- 327. Yuan J., Yanker B.A. (2000). "Apoptosis in the nervous system". *Nature* 407: pp. 802 - 809
- 328. Zhang Q., Ji R.R., Lindsay R., Hokfelt T. (1995). "Effect of growth factor on substance P mRNA expression in axotomized dorsal root ganglia". *Neuroreport* 6: pp. 1309 – 1312
- 329. Zhang Y., Yao B., Delikat S., Bayoumy S., Lin X.H., Basu S., McGinley M., Chan-Hui P.Y., Lichtenstein H., Kolesnick R. (1997). "Kinase suppressor of Ras is ceramide-activated protein kinase". *Cell* 89: pp. 63 – 72

## 8. Abbildungsverzeichnis

- Abbildung 1.1: Übersicht der Zellentwicklung im Knochenmark aus hämatopoetischen Stammzellen (*Melcher et al. 1999*).
- Abbildung 1.2: Differenzierung und Migration der B-Zellen im Stroma des KM's (*Melcher und Rolink 1999*).
- Abbildung 1.3: Schema des *trk*- Neurotrophin- Rezeptors.
- Abbildung 1.4: Schema des  $p75^{NTR}$ - Pan- Neurotrophin- Rezeptors.
- Abbildung 1.5: Interaktionsmodelle zwischen  $p75^{NTR}$  und *trk*- Rezeptoren (*nach Barrett et al. 1999*).
- Abbildung 1.6: Die *trk*- Rezeptor vermittelte Signalkaskade
- Abbildung 1.7: Die  $p75^{NTR}$ - vermittelte Signalkaskade
- Abbildung 1.8: Mechanismen der Interaction zwischen  $p75^{NTR}$  und *trk*- Rezeptoren und der resultierende Effekt (*nach Chao et al. 1998*)
- Abbildung 3.1: Präparationssitus (*Roit I. et al. 1995*).
- Abbildung 3.2: Zellfraktionen nach Dichtegradientenzentrifugation.
- Abbildung 3.3: Schädel und Gehirn der Maus (*Hummel KP et al. 1941; Popesko P et al. 1990*).
- Abbildung 3.4: Zählkammer nach Neubauer (*Institut der Klinischen Chemie und Molekularen Diagnostik, Marburg 1999*).
- Abbildung 3.5: Zählnetzbereich der Zellzählkammer nach Neubauer (*Institut der Klinischen Chemie und Molekularen Diagnostik, Marburg 1999*).
- Abbildung 3.6: MACS- Separator mit Säule im Magnetfeld (*Miltenyi Biotech Protocol 2000*).

- Abbildung 3.7: Prinzip der Messung von Größe und Granularität im FACS- Scan (*Becton Dickinson Immunocytometry Systems 1998*).
- Abbildung 3.8: Schema der Funktionsweise von Fluorochrome-Molekülen (*Becton Dickinson Immunocytometry Systems 1998*).
- Abbildung 3.9: Prinzip der analytischen Durchflußzytometrie (Kayser et al. 1998).
- Abbildung 3.10: cDNA- Synthese (*Invitrogene Life Technologies 1999*).
- Abbildung 3.11: Schema eines PCR- Zyklus.
- Abbildung 3.12: RoboCycler<sup>®</sup> Thermal- PCR- Cycler (*Stratagene RoboCycler<sup>®</sup> Instruction Manual 200*).
- Abbildung 3.13: Molekülstruktur des Ethidiumbromids (*Roche Diagnostics Cooperation 2004*).
- Abbildung 3.14: Zunahme der Fluoreszenzintensität in der Amplifikation (*Qiagen QuantiTect<sup>™</sup> SYBR<sup>®</sup> Green PCR Handbook 2002*).
- Abbildung 3.15: SYBR<sup>®</sup> Green I - Farbstoff (*Roche Diagnostics Cooperation 2004*).
- Abbildung 3.16: Schmelzkurvendarstellung in der ersten mathematischen Ableitung (*Qiagen QuantiTect<sup>™</sup> SYBR<sup>®</sup> Green PCR Handbook 2002*).
- Abbildung 3.17: LightCycler<sup>®</sup>- System (*Roche Diagnostics Cooperation 2004*).
- Abbildung 4.1: 17 Tage alte C57BL/6 Wildtyp- Maus.

- Abbildung 4.2: Durchschnittliche Gewicht von Gehirn, Milz und zweier Femora von 17 Tagen alten C57BL/6 Wildtyp Versuchsmäusen.
- Abbildung 4.3: Relative Zellzahlen der präparierten Organe 17 Tage alter C57BL/6 Mäuse.
- Abbildung 4.4: FACS- Analyse der Reinheit der MACS- Separation nach CD45R/B220 für die Zellen der Milz und des KM.
- Abbildung 4.5: Reinheit der B-Zell-Extraktion durch MACS, gemessen anhand der relativen Häufigkeit an CD45R/B220- R-PE- Fluoreszenzereignissen im FACS
- Abbildung 4.6: Zellverteilung im KM von 17 Tagen alten C57BL/6 Wildtypmäusen im FACS
- Abbildung 4.7: Zellsubpopulationen im KM von 17 Tagen alten C57BL/6 Wildtypmäusen
- Abbildung 4.8: Zellverteilung in der Milz von 17 Tage alten C57BL/6 Mäuse im FACS
- Abbildung 4.9: Zellsubpopulationen in der Milz von 17 Tagen alten C57BL/6 Wildtypmäusen
- Abbildung 4.10: RNA- Auftrennung in der Agarosegelelektrophorese
- Abbildung 4.11: Ergebnis der RNA- Extraktion aus den B-Zellen aus Milz und KM und den Zellen des Gehirns
- Abbildung 4.12: Etablierung der PCR- Bedingungen mit cDNA aus Gehirn
- Abbildung 4.13: PCR der Primer aller NTs und NT- Rezeptoren aus dem Gehirn von C57BL/6
- Abbildung 4.14: PCR der Primer aller NTs und NT- Rezeptoren aus KM von C57BL/6

- Abbildung 4.15: PCR der Primer aller NTs und NT- Rezeptoren aus der Milz von C57BL/6
- Abbildung 4.16: Untersuchung der Expression des trkB (gp 145) NT- Rezeptors auf CD45R(B220) positiven B-Zellen des KMs und der Milz
- Abbildung 4.17: Standardisierung und Etablierung der Methodik der quantitativen PCR mittels LightCycler® mit den Zellen aus dem Gehirn von C57BL/6- Wildtypmäusen
- Abbildung 4.18: Schmelzkurve der PCR- Produkte aus dem Versuch der Standardisierung und Etablierung der quantitativen PCR mit Zellen des Gehirns
- Abbildung 4.19: Quantitative Darstellung der BDNF- Expression der B-Zellen des KMs und der Milz
- Abbildung 4.20: Quantitative Darstellung der NT-3- Expression der B-Zellen des KMs und der Milz
- Abbildung 4.21: Quantitative Darstellung der NGF- Expression der B-Zellen des KMs und der Milz
- Abbildung 4.22: Schmelzkurvendarstellung der Neurotrophine BDNF, NT-3 und NGF aus den B-Zellen der Milz und aus dem KM
- Abbildung 4.23: Quantitative Darstellung der trkB(gp 95)- Expression der B-Zellen des KMs und der Milz
- Abbildung 4.24: Quantitative Darstellung der trkC- Expression der B-Zellen des KMs und der Milz
- Abbildung 4.25: Schmelzkurvendarstellung der NT- Rezeptoren trkC und trkB(gp 95) aus den B-Zellen der Milz und des KMs

## 9. Tabellenverzeichnis

Tabelle 1.1:	Expression verschiedener B-Zell-Marker in Abhängigkeit ihres Differenzierungsstadiums ( <i>modifiziert nach Melcher F. und Rolink A. 1999</i> )
Tabelle 1.2:	Neurotrophine und deren Rezeptoren auf Immunzellen und Stromazellen/ resultierende Neurotrophinwirkung
Tabelle 2.1:	Geräte und Hilfsmittel für Zellgewinnung, Zellseparation und Zellzählung
Tabelle 2.2:	Geräte und Hilfsmittel für die Magnetisch aktivierte Zell Separation (MACS)
Tabelle 2.3:	Geräte und Hilfsmittel für die Fluoreszenz aktivierte Zell Separation (FACS)
Tabelle 2.4:	Geräte und Hilfsmittel für die qualitative Polymerase Ketten Reaktion (PCR), cDNA- Synthese, RNA-Gewinnung, Agarosegelelektrophorese
Tabelle 2.5:	Hilfsmittel und Geräte für die quantitative Polymerase Ketten Reaktion (PCR)
Tabelle 2.6:	Lösungen und Reagenzien für Zellgewinnung, Zellseparation und Zellzählung
Tabelle 2.7:	Lösungen und Reagenzien für die Magnetisch aktivierte Zellseparation (MACS)
Tabelle 2.8:	Lösungen und Reagenzien für die Fluoreszenz aktivierte Zell Abtastung (FACS)
Tabelle 2.9:	Lösungen und Reagenzien für die qualitative Polymerase Ketten Reaktion (PCR), cDNA- Synthese, RNA-Gewinnung, Agarosegelelektrophorese



Tabelle 2.10:	Primer- Design für die qualitative Polymerase Ketten Reaktion (PCR)
Tabelle 2.11:	Lösungen und Reagenzien für die quantitative Polymerase Ketten Reaktion (PCR)
Tabelle 2.12:	Primer – Design für die quantitative Polymerase Ketten Reaktion (PCR)
Tabelle 3.1:	RNA- Primer- Ansatz ( <i>Invitrogene Life Technologies 1999</i> )
Tabelle 3.2:	cDNA- Reaktionsansatz ( <i>Invitrogene Life Technologies 1999</i> )
Tabelle 3.3:	Taq- Polymerase Eigenschaften ( <i>Gassen et al. 1994</i> ).
Tabelle 3.4:	PCR- Reaktionsansatz ( <i>Qiagen HotStarTaq™ PCR Handbook 1999</i> ).
Tabelle 3.5:	Einstellungen und Reaktionsbedingungen für den thermalen RoboCycler® ( <i>Qiagen HotStarTaq™ PCR Handbook 1999</i> ).
Tabelle 3.6:	PCR- Reaktionsansatz für das LightCycler® System ( <i>Qiagen QuantiTect™ SYBR® Green PCR Handbook 2002</i> ).
Tabelle 3.7:	PCR- Reaktionsbedingungen des LightCycler® Systems ( <i>Qiagen QuantiTect™ SYBR® Green PCR Handbook 2002</i> ).
Tabelle 4.1:	Reinheitsgrad und Kontaminationswahrscheinlichkeit nach Extraktion der mononukleären Zellfraktion mit Lympholyte®-M ( <i>Biozol Diagnostica and Linaris GmbH 2000</i> ).
Tabelle 4.2:	Primer der qualitativen PCR und deren errechnete Produktgröße ( <i>Metabion GmbH 2002</i> )

Tabelle 4.3:	Differenz der Schwellenzyklen der NTs und NT-Rezeptoren aus dem Gehirn von C57BL/6 mit dem C <sub>T</sub> des Beta-Aktin
Tabelle 4.4:	Vergleich der Schwellenzyklen zwischen Beta-Aktin und BDNF, NT-3 sowie NGF für die B-Zellen aus dem KM und der Milz
Tabelle 4.5:	Ergebnisse der quantitativen Untersuchung der NTs für die CD45R(B220) positiven Zellen aus dem KM und der Milz im Vergleich
Tabelle 4.6	Vergleich der Schwellenzyklen zwischen Beta-Aktin und trkC und trkB(gp 95) für die B-Zellen aus dem KM und der Milz
Tabelle 4.7	Ergebnisse der quantitativen Untersuchung der NT-Rezeptoren für die CD45R(B220) positiven Zellen aus dem KM und der Milz im Vergleich

## 10. Danksagung

Diese Arbeit wurde unter der Anleitung von Frau Dr. med. U. Raap angefertigt, der ich für die Unterstützung und Anregungen dieser Arbeit zu Dank verpflichtet bin.

Einen besonderen Dank möchte ich auch Herrn Professor Dr. med. Harald Renz für sein Engagement sowie für die Möglichkeit, in seinem Forschungsbereich zu promovieren, aussprechen, er stand mir jederzeit mit seinen wissenschaftlichen Ratschlägen zur Seite.

Zudem danke ich Dipl. Biologin Berit Schuhmann und Dr. Serdar Sel für ihre freundschaftliche Unterstützung und vielen guten Ratschlägen. Des Weiteren gilt mein Dank den Mitarbeitern und Mitarbeiterinnen des Forschungsbereiches „Neurotrophine“ des Labor der Klinischen Chemie der Philipps- Universität zu Marburg: Verena Kräling, Anja Spies, Kai Vi sowie Michael Schuhmann, ganz besonders Britta Kosche, die mich in alle notwendigen Methoden einarbeitete.

Meinen Eltern bin ich sehr zu Dank verpflichtet, da sie immer an mich geglaubt hatten.

Einen ganz besonderen Dank gilt einem meiner besten Freunde und seiner Frau: Timo und Mareike Götz, die mich immer wieder motiviert haben, nach langen Nachtdiensten mich doch noch an diese Arbeit zu setzen.

Meiner Lebensgefährtin und Freundin Christina Erkmann danke ich für jedes motivierende und aufmunternde Wort.

## 11. Persönliche Daten

### 11.1 Verzeichnis der akademischen Lehrer

Meine akademischen Lehrer im Rahmen meines Studiums der Humanmedizin der Philipps- Universität zu Marburg waren folgende Damen und Herren (namentliche Nennung ohne Titel):

Arnold, Aumüller, Bach, Barth, Basler, Baum, Becker, Behr, Bertalanffy, Beyer, Bien, Cetin, Christ, Christiansen, Czubayko, Daut, Eilers, Engel, Engelhart-Cabillic, Feuser, Gemsa, Geus, Görg, Gotzen, Griss, Grzeschick, Gudermann, Hamer, Happle, Hasilik, Heeg, Hellinger, Hesse, Höffken, Hörle, Hofmann, Holst, Kaluza, Kern, Klenk, Klose, König, Koolmann, Kretschmer, Krieg, Kroll, Kühnert, Lammel, Lang, Lange, Lill, Lohoff, Maisch, Moll, Moosdorfer, Müller, Mutters, Neubauer, Oertel, Pfeiffer, Printz, Remschmidt, Renz, Richter, Ritter, Röhm, Rothmund, Schäfer, Schmidt, Schneyer, Schnabel, Seitz, Schüffel, Schwarz, Seyberth, Simon, Steiniger, Suske, Töllner, Vedder, Vogelmeier, Voigt, Wagner H.-J., Wagner U., Walthers, Weihe, Werner, Westermann, Wulf

## 11.2 Publikationen und Poster

### 11.2.1 Poster und Abstracts:

**1. „ $\alpha$ - Melanocyte stimulating hormon ( $\alpha$ - MSH) is a modulator of immune responses in allergen- induced airway inflammation in vivo“ (2001)**

U.Raap, T. Brzoska, S. Sohl, J. Emmel, G. Päch, U. Herz, T.A. Luger, H. Renz, A. Braun in Allergo Journal, Vol. 10, Seite 35

Das Ergebnis- Poster wurde überdies im Official Journal of the European Academy of Allergology and Clinical Immunology (2001), Supplement 68; Vol. 56; Seite 21 publiziert.

**2. “Differentiell expression of neurotrophins and neurotrophin receptors in mouse B-cells”(2002)**

J. Emmel, B. Schuhmann, H. Renz and W.A. Nockher in Immunobiology, Vol. 206, Seite 312

Das Poster wurde auf dem 33<sup>rd</sup> Annual Meeting of the German Society of Immunology (DGI) vom 25.-28.09.2002 in Marburg an der Lahn präsentiert.

### 11.2.2 Publikationen:

**1. “Melanocyte-Stimulating Hormone Inhibits Allergic Airway Inflammation”(2003)**

Ulrike Raap, Thomas Brzoska, Sirius Sohl, Günter Päch, Jörg Emmel, Udo Herz, Armin Braun, Thomas Luger, and Harald Renz

The Journal of Immunology, 170: 353 – 359.

**2. „Tabletten, Tropfen und Tinkturen - Medizin im Alltag“**

C. Bartels, H. Göllner, J. Koolman, E. Maser, K.-H. Röhm (Hrsg.)

Kapitel 13 „Die Last mit dem Zucker – Behandlung von Diabetes mellitus“

C.Bartels, J. Emmel

Wiley-VCH Verlag GmbH, 2005, ISBN: 3527302638

### 11.3 Eidesstattliche Erklärung

Ich erkläre hiermit an Eides statt, dass die vorliegende Dissertation mit dem Titel „Molekularbiologische Untersuchung der Expression von Neurotrophen und Neurotrophin- Rezeptoren auf murinen B- Zellen im Knochenmark und in der Milz von C57BL/6“ in dem Institut der Klinischen Chemie und Molekularen Diagnostik des Klinikums der Philipps- Universität zu Marburg unter der Leitung von Prof. Dr. med. H. Renz und der Betreuung von Frau Dr. med. U. Raap von mir selbst und ohne Hilfe von Seiten Dritter verfasst wurde. Die in dieser Arbeit dargestellten Versuche und Ergebnisse sind von mir durchgeführt bzw. erhoben worden. Zudem stellt diese Promotionsschrift keine - auch nur in Teilauszügen - Kopie anderer Arbeiten oder Veröffentlichungen dar. Die benutzten Hilfsmittel sowie die verwendete Literatur und Abbildungen sind als solche kenntlich gemacht und vollständig angegeben. Ich habe bisher an keinem in- und ausländischen medizinischen Fachbereich ein Gesuch um Zulassung zur Promotion eingereicht noch die vorliegende oder eine andere Arbeit als Dissertation vorgelegt.

Kassel, den 26.02.2010

---

Jörg Emmel